

526,494

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



Rec'd PCT/PTO

04 MAR 2005

(43) 国際公開日
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

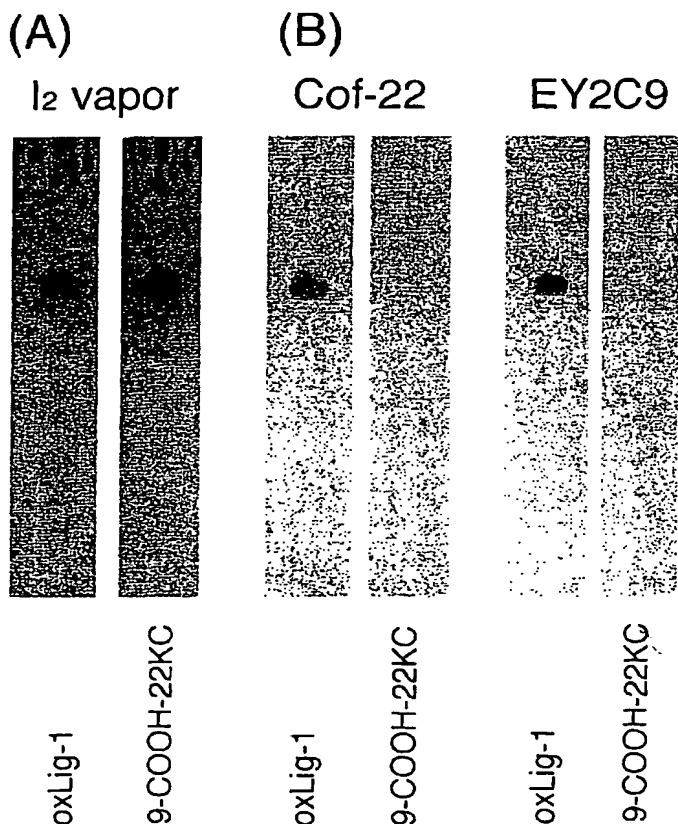
(10) 国際公開番号
WO 2004/023141 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 33/96 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011388
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 5 日 (05.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-261366 2002 年 9 月 6 日 (06.09.2002) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 松浦 栄次 (MATSUURA, Eiji) [JP/JP]; 〒700-0916 岡山県岡山市西之町7丁目20-801 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ASSAYING OXIDIZED LDL- β 2-GLYCOPROTEIN I COMPLEX *IN VIVO*

(54) 発明の名称: 生体内の酸化LDL- β 2-グリコプロテイン I 複合体の測定方法



(57) Abstract: By using a complex composed of oxLDL and β 2-GPI covalently bonded to each other as a standard for assaying a β 2-GPI-oxLDL complex *in vivo*, the β 2-GPI-oxLDL complex can be more accurately and strictly assayed *in vivo*. Using the same, moreover, a novel assay method, a detection method, kit, etc. can be obtained.

(57) 要約: oxLDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体を、生体内の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダードとして用いることにより、生体内の β 2-GPI-oxLDL複合体を、より正確かつ厳密に測定することができ、更にこれを利用することにより新たな測定方法、検出方法、キットなどが得られる。

WO 2004/023141 A1

BEST AVAILABLE COPY



添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

生体内の酸化LDL- β 2-グリコプロテインI複合体の測定方法

5 技術分野

本発明は、生体内に存在する「酸化LDL (oxLDL) と β 2-グリコプロテインI (β 2-GPI) との複合体」(β 2-GPI-oxLDL複合体)の測定に有用なスタンダード、及びこれを利用した生体内の β 2-GPI-oxLDL複合体の測定方法等に関する。

背景技術

10 まず、本明細書において用いる略号を説明する。

a P L : 抗リン脂質抗体

a C L : 抗カルジオリピン抗体

A P S : 抗リン脂質抗体症候群

β 2-GPI : β 2-グリコプロテインI

15 β 2-GPI-oxLDL複合体 : oxLDLと β 2-GPIとの複合体

B S A : ウシ血清アルブミン

C L : カルジオリピン

Cu^{2+} -oxLDL : $CuSO_4$ で酸化したoxLDL

D E A E : ジエチルアミノエチル

20 E D T A : エチレンジアミン四酢酸

E L I S A : 酵素結合免疫吸着アッセイ

H R P : ホースラディッシュ (西洋ワサビ) のペルオキシダーゼ

L D L : 低密度リポタンパク質

M D A : マロンジアルデヒド

25 O D : 吸光度

oxLDL : 酸化LDL

oxLig-1 : 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate; 9-oxo-9-(7-ketocholest-5-en-3 β -yloxy)nonanoic acid (IUPAC)

oxLig-2 : 7-ketocholesteryl-12-carboxy(keto)dodecanoate

P A P S : 原発性抗リン脂質抗体症候群

P B S : リン酸緩衝生理食塩液

P L (P L s) : リン脂質

S L E : 全身性エリテマトーデス

5 T B A R S : チオバルビツール酸反応性物質

T L C : 薄層クロマトグラフィー

9-COOH-22KC : 7-ketocholesteryl-13-carboxytridecanoate;13-oxo-13-(7-ketocholest-5-en-3 β -yloxy)tridecanoic acid

β 2-GPIは、A P S 患者に存在する「抗リン脂質抗体」が認識する主要な抗原
10 であり、oxLDLに特異的に結合し、酸化されていない（ネイティブな）LDLには結合しないことが知られている。国際公開第95/9363号パンフレットには、このような β 2-GPIとoxLDLとの特異的結合能を利用したoxLDLの測定方法や、これを応用した動脈硬化性疾患の診断用キット等が開示されている。またJ. Lipid Res., 42, p697-709(2001)[文献7]には、 β 2-GPIが、oxLDL中のoxLig-1
15 構造部分を認識して結合することが開示されている。

oxLDLは生体内で β 2-GPIとの複合体（ β 2-GPI-oxLDL複合体）を形成しており、生体内に存在するこの複合体を測定することによって種々の疾患の検出を行うことができる。そして生体内に存在するこの複合体を測定する際のスタンダードとして、従来、Cu²⁺-oxLDLと β 2-GPIとをプレインキュベーションすることなく
20 接触させたものが測定に用いられてきた。

生体内に存在する難解離性の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダードは、生体内に存在する複合体と同一又は可能な限り近似していることが望まれる。しかし、生体内に存在する β 2-GPI-oxLDL複合体や、従来スタンダードとして用いられてきた β 2-GPI-oxLDL複合体におけるoxLDLと β 2-GPIとの結合様式
25 等については知られていなかった。

発明の開示

本発明は、生体内に存在する β 2-GPI-oxLDL複合体の測定に有用なスタンダード、及びこれを利用した生体内の β 2-GPI-oxLDL複合体の測定方法等に関する。

本発明者は、生体内に存在する β 2-GPI-oxLDL複合体におけるoxLDLと β 2-GPI

との結合様式を検討した結果、驚くべきことにその大部分が共有結合、又は少なくとも静電的な結合力を上回る強い結合を形成していることを見出した。一方、従来スタンダードとして用いられてきた、プレーンキュベーションすることなく接触させたoxLDLと β 2-GPIとを測定に供する場合、それらによる複合体における

5 結合は、単なる静電的な結合であることを見出した。

従来のスタンダードも、生体内に存在する β 2-GPI-oxLDL複合体の測定に使用しうるものではある。しかし、より正確かつ厳密な測定を行うためには、前記の通り、生体内に存在する複合体に可能な限り近似していることが望ましい。

そこで本発明者は、前記の新規な知見に基づき、 β 2-GPI-oxLDL複合体を測定
10 するための新規なスタンダード、これを利用した β 2-GPI-oxLDL複合体の測定方法、この測定方法を利用した疾患の検出方法、前記スタンダードを利用した、 β 2-GPI-oxLDL複合体の測定キット等を提供するに至り、本発明を完成した。

また本発明者は、生体内に存在する「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」
(自己抗体)の測定に用いる抗原も、生体内に存在する β 2-GPI-oxLDL複合体に
15 可能な限り近似していることが望ましいことにも着目し、「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」を測定するための新規な抗原、これを利用した「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の測定方法、この測定方法を利用した疾患の検出方法、前記抗原が固着された固相、この固相を利用した、「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の測定キット等を提供するに至り、本発明を完成した。

20 すなわち本発明は、oxLDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体を成分とする、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダード（以下、本発明スタンダード1という）を提供する。

また本発明は、「oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL複合体」を成分と
25 する、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダード（以下、本発明スタンダード2という）を提供する。本発明スタンダード2における「oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL複合体」は、以下の(a)及び(b)の性質を有するものが好ましい。

(a) 100単位/mlのヘパリンを共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。

(b) 10mMのMgCl₂を共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。

- 5 また本発明スタンダードを用いた測定に付される「検体」は、生体由来の検体であることが好ましい。また、この「生体由来の検体」は血液であることが好ましい。

以下、本発明スタンダード1及び2を併せて、単に「本発明スタンダード」という。

- 10 また本発明は、本発明スタンダードを用いることを特徴とする、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体の測定方法（以下、本発明測定方法1という）を提供する。本発明測定方法1は、検体中の「oxLDL」と「 β 2-GPI」とを共有結合させるステップを少なくとも含むものが好ましい。また、検体中の「oxLDL」と「 β 2-GPI」とを、予めpH3～9の条件下でインキュベートするステップを少なくとも含むものも好ましい。また、検体中の「『oxLDL』と『タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、アミノ糖又はアミノ脂質』とが静電的に結合した複合体」を解離させるステップを少なくとも含むものも好ましい。
- 15

- また本発明は、本発明測定方法1を用いて検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定し、測定された「検体中の当該複合体」と疾患とを関連づけることを特徴とする、疾患の検出方法（以下、本発明検出方法1という）を提供する。本発明検出方法1によって検出される疾患は、APS、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化（脳梗塞、心筋梗塞など）及び糖尿病からなる群から選ばれるものが好ましい。
- 20

- また本発明は、本発明スタンダードを構成成分として含むことを特徴する、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体の測定キット（以下、本発明キット1という）を提供する。本発明キット1は、さらに「『oxLDLと β 2-GPIとの複合体』を認識する抗体」を構成成分として含むことが好ましい。また本発明キット1は、疾患の検出に用いられるものが好ましい。
- 25

また本発明は、「oxLDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体」を成分とする、検

体中の「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」を測定するための抗原（以下、本発明抗原1という）を提供する。

また本発明は、「oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL複合体」を成分とする、検体中の「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」を測定するための抗原（以下、本発明抗原2という）を提供する。本発明抗原2における「oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL複合体」は、以下の(a)及び(b)の性質を有するものが好ましい。

- 10 (a) 100単位/mlのヘパリンを共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。
- (b) 10mMのMgCl₂を共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。

以下、本発明抗原1及び2を併せて、単に「本発明抗原」という。

- 15 また本発明は、本発明抗原を用いることを特徴とする、検体中の「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の測定方法（以下、本発明測定方法2という）を提供する。

また本発明は、本発明測定方法2を用いて検体中の「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」を測定し、測定された「検体中の当該抗体」と疾患とを関連づけることを特徴とする、疾患の検出方法（以下、本発明検出方法2という）を提供する。本発明検出方法2によって検出される疾患は、APS、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化（脳梗塞、心筋梗塞など）及び糖尿病からなる群から選ばれるものが好ましい。

- 25 また本発明は、本発明抗原が固着された固相（以下、本発明固相という）を提供する。

また本発明は、本発明固相を構成成分として含むことを特徴する、検体中の「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の測定キット（以下、本発明キット2という）を提供する。本発明キット2は、さらに「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」に結合する物質を構成成分として含むことが好ましい。また本発明キ

ット2は、疾患の検出に用いられるものが好ましい。

また本発明は、「 β 2-GPIを認識する抗体」及び／又は「LDLを認識する抗体」、並びに抗IgG抗体を用いることを特徴とする、検体中の免疫複合体の測定方法（以下、本発明測定方法3という）を提供する。

5 図面の簡単な説明

図1は、オキシステロールエステルの2つの ω -カルボキシル変異体（oxLig-1及び9-COOH-22KC）のリガンドプロット分析を示す図である。TLCプレート上で展開したリガンドを I_2 の噴霧（ I_2 vapor）で染色し（A）、リガンドプロットは抗 β 2-GPI抗体（Cof-22（B）及びEY2C9（C））を用いて行った。

- 10 図2は、 Cu^{2+} で酸化したoxLDLと β 2-GPIとの複合体形成プロファイルを示す図である。

（A）：oxLDL12h（apoB相当で、0（白三角印）、0.16（白四角印）又は2.5 μ g/ml（白丸印）を、ウェル中で種々の濃度の β 2-GPIとインキュベートし、 β 2-GPI-oxLDL複合体を検出するためのELISAを行った。

- 15 （B）：図中に示した濃度のoxLDL12h（LDLを5 μ M $CuSO_4$ によって37°Cで12時間処理したもの；丸印）又はネイティブなLDL（四角印）を、 β 2-GPIの非存在下（白色）又は存在下（25 μ g/ml；黒色）でインキュベートし、ELISAを行った。

（C）：図中に示した濃度のoxLDL12h及び β 2-GPI（25 μ g/ml）をウェル中でインキュベートし、非存在下（白丸印）、ヘパリン（100単位/ml）の存在下（黒四

- 20 角印）又は $MgCl_2$ （10mM）の存在下（黒菱形印）でELISAを行った。

（D）：oxLDL12h- β 2-GPI16h複合体は、oxLDL12h（100 μ g/ml）を β 2-GPI（100 μ g/ml）とともに37°Cで16時間インキュベートすることによって調製した。ELISAは、この複合体（apoB相当で2.5 μ g/ml）を用いて、非存在下（白丸印）、ヘパリン（100単位/ml）の存在下（黒四角印）又は $MgCl_2$ （10mM）

- 25 の存在下（黒菱形印）で行った。データは、3つのサンプルの平均値 \pm SDで示した。

図3は、 Cu^{2+} で酸化したoxLDLと β 2-GPIとの複合体形成の経時変化を示す図である。

（A）：LDL（図中に示した時間、5 μ M $CuSO_4$ で処理したもの）中のTBARS

を測定した。

(B) : Cu^{2+} -oxLDL (apoB相当で $2.5 \mu\text{g/ml}$) を $\beta 2\text{-GPI}$ ($0 \mu\text{g/ml}$ (白丸印) 、
 $25 \mu\text{g/ml}$ (黒丸印)) とともにウエル中でインキュベーションすることによって
 $\beta 2\text{-GPI}$ -oxLDL複合体を生成させ、ELISAを行った。 $25 \mu\text{g/ml}$ の $\beta 2\text{-GPI}$ を共存さ
5 せたELISAは、ヘパリン (100 単位/ ml ; 黒四角印) 又は MgCl_2 (10mM ; 黒菱形
印) の存在下においても行った。

(C) : oxLDL12h ($100 \mu\text{g/ml}$) を $\beta 2\text{-GPI}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) とともに 4°C (点線)
又は 37°C (実線) 条件下で図示した時間インキュベートすることにより生成し
た $\beta 2\text{-GPI}$ -oxLDL複合体を、ELISAで検出した。ELISAは、ヘパリン及び
10 MgCl_2 の非存在下 (白丸印) 、又はヘパリン (100 単位/ ml ; 黒四角印) 若しくは
 MgCl_2 (10mM ; 黒菱形印) の存在下においても行った。

(D) : $\beta 2\text{-GPI}$ -oxLDL複合体は、LDL ($100 \mu\text{g/ml}$) と $\beta 2\text{-GPI}$ ($100 \mu\text{g/ml}$) と
を、 37°C における Cu^{2+} ($5 \mu\text{M}$) 酸化の過程で、同時にインキュベートすることによ
って形成され、 $\beta 2\text{-GPI}$ -oxLDL複合体 (apoB相当で $2.5 \mu\text{g/ml}$) はELISAによ
15 て検出された。ELISAは、ヘパリン (100 単位/ ml ; 黒四角印) 若しくは
 MgCl_2 (10mM ; 黒菱形印) の存在下、又は非存在下 (白丸印) でも行った。デー
タは、3つのサンプルの平均値 \pm SDで示した。

図4は、oxLDL12h- $\beta 2\text{-GPI}$ 16h複合体の安定性と、種々のpH条件におけるそ
の NaCNBH_3 -還元型を示す図である。

20 oxLDL12h- $\beta 2\text{-GPI}$ 16h複合体 (apoB相当で $100 \mu\text{g/ml}$) を、PBS中で、 200mM
 NaCNBH_3 を用い、pH7.4で16時間処理することによって還元した。還元されて
いない、又は還元された複合体は、 10mM MgCl_2 の非存在下又は存在下、図示し
たpH条件下で、 37°C 、16時間インキュベートした。 300ng/ml のLDL (apoB相
当) を含有するこの調製物中の $\beta 2\text{-GPI}$ -oxLDL複合体をELISAによって測定した。
25 データは、3つのサンプルの平均値 \pm SDで示した。

図5は、患者の血清中に存在する $\beta 2\text{-GPI}$ -oxLDL複合体を示す図である。

(A) : ネイティブなLDL (nLDL) - $\beta 2\text{-GPI}$ 16h (ネイティブなLDLと $\beta 2\text{-GPI}$ を 37°C で16時間インキュベートした反応混合物 ; ネガティブコントロール)
(apoB相当で 300ng/ml) 、oxLDL12h- $\beta 2\text{-GPI}$ 16h (300ng/ml) 又は100倍希釈し

た β 2-GPI-oxLDL複合体陽性の血清を、ヘパリン (100単位/ml) 若しくは MgCl_2 (10mM) の存在下、又は非存在下でインキュベートした。

(B) : β 2-GPI-oxLDL複合体陽性の血清を、 MgCl_2 [10mM] 存在下、pH10、37℃で16時間ブレインキュベートし、ELISAを行った。データは、2つのサン

5 プルの平均値で示した。

図6は、ELISAで検出された β 2-GPI-oxLDL複合体の血清レベルを示す図である。

健常人、原発性のAPS (PAPS)、SLEを伴うAPS (第2期のAPS) 又はAPSを伴わないSLEの患者から採取した血清を100倍希釈し、 β 2-GPI-oxLDL複合体を検出した。

10 カットオフ値 (1U/ml) は、50人の健常人の平均値の標準偏差の3倍となるように調整した。図中の数字は、各群における平均値を示す。

図7は、3つの異なるELISA系で検出された β 2-GPI関連IgG抗体の抗体価の相互関係を示す図である。

(A) : 「 β 2-GPI依存性 IgG a C L (抗 β 2-GPI-C L IgG抗体)」と「抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体」との関係。

(B) : 「抗 β 2-GPI IgG抗体 (β 2-GPIでコートしたポリ酸化プレートを用いたELISAで検出)」と「抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体」との関係。

図8は、IgG抗体価とIgG免疫複合体レベルとの相互関係を示す図である。

(A) : 「抗 β 2-GPI IgG抗体」と「 β 2-GPIとのIgG免疫複合体(IC)」との関係。

20 (B) : 「抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体」と「LDLとのIgG免疫複合体」との関係。

(C) : 「 β 2-GPIとのIgG免疫複合体」と「LDLとのIgG免疫複合体」との関係。

図9は、「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」のELISAによる検出結果を示す図である。(A) β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体の血清レベルを示す図。

(B) 「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」と「抗 β 2-GPI IgG抗体」との関係。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施の形態を説明する。

本発明スタンダード

< 1 > - 1 本発明スタンダード1

本発明スタンダード1は、oxLDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体を成分とする、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダードである。

本発明スタンダード1を構成する「oxLDL」は、LDLを酸化させることによって調製することができる。酸化の方法は特に限定されないが、 Cu^{2+} とともにインキュベートする方法が例示され、かつ好ましい。例えば、LDLを5 μM 程度の CuSO_4 とともに37℃程度の温度でインキュベートすることによって、LDLを酸化させることができる。この場合、酸化反応を停止させるためにはEDTA等のキレート剤を添加すればよい。この方法の具体例は、後述の実施例を参照されたい。

10 また、本発明スタンダード1を構成する「 β 2-GPI」は、哺乳動物の血清等から取得することもでき、遺伝子工学的手法によって生産させることもできる。

「 β 2-GPI」の由来は特に限定されないが、測定に付される「検体」が採取された動物種と同一の動物種由来のものが好ましい。例えば、測定に付される検体がヒトの血清である場合には、ヒト由来の β 2-GPIを用いることが好ましい。

15 本発明スタンダード1は、このような「oxLDL」と「 β 2-GPI」とが共有結合した複合体を成分とするものである。両者を共有結合させる方法は特に限定されず、公知の手法から適宜選択することができる。

このような方法で「oxLDL」と「 β 2-GPI」とを共有結合させることにより、これら両者が難解離性の複合体を形成する。本発明スタンダード1は、このような「oxLDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体」を、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダードとしたものである。

本明細書における「測定」との用語は、ある物質を定量的に測定することのみならず、定性的に検出すること（ある物質の存否を検出すること）をも含む概念である。

25 本明細書における「スタンダード」との用語は、ある物質の測定の際に用いる「標準物質」を意味する。すなわち、ある物質Aについて定量的又は定性的な測定を行う際には、基準となる当該物質A（標準物質）が必要になる。例えば、検体中の物質AをODによって定量的に測定する場合には、所定の濃度に調製した物質A（標準物質）についてODを測定し、この標準物質のOD値と、検体のO

D値を比較することによって検体中の物質Aの濃度を求めることができる。また例えば、検体中における物質Aの存否を判定する場合（物質Aを定性的に測定する場合）には、物質A（標準物質）の物理化学的性質や生物学的性質（例えば抗原性等）を基準とし、これと同一の性質を示す物質の存否を指標として、検体中における物質Aの存否を判定（物質Aを定性的に測定）することができる。この
5 ような測定において用いる「標準物質」は、本明細書における「スタンダード」の典型例である。

本発明スタンダード1は、「oxLDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体」を成分とする限りにおいて、さらに他の成分を含んでいてもよい。ここにいう「他の成分」は、「oxLDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体」自体の物理化学的性質や生物学的性質（例えば抗原性等）に影響を与えず、かつ、当該複合体のスタンダードとしての機能の発揮を阻害しないものである限りにおいて特に限定されない。
10 ここにいう「他の成分」としては、通常の試薬の調製に用いられる賦形剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤等が例示される。

また、本発明スタンダード1の形態も、スタンダードとして使用する際に所望の形態となしうる限りにおいて特に限定されず、例えば溶液、凍結物、凍結乾燥物等の形態を採用しうる。これを、アンプル、バイアル、シリンジ、ボトル等の適当な容器に充填し、そのまま流通させあるいは保存して、測定の際にスタンダードとして用いることができる。

20 <1>-2 本発明スタンダード2

本発明スタンダード2は、「oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL複合体」を成分とする、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダードである。

25 本発明スタンダード2における「oxLDL」及び「 β 2-GPI」についての説明は、前記の「本発明スタンダード1」における説明と同様である。

本発明スタンダード2は、このようなoxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL複合体を成分とするものである。「得られうる」としたのは、本発明スタ

ンダード2の成分である β 2-GPI-oxLDL複合体は、「oxLDLと β 2-GPIとを37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって実際に得られた物」に限られるわけではなく、これと異なる方法によって得られた複合体であっても良いという趣旨である。したがって、異なる方法で得られた β 2-GPI-oxLDL
5 複合体が、「oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって実際に得られた β 2-GPI-oxLDL複合体」と物質的に同一と評価される場合には、当該異なる方法で得られた β 2-GPI-oxLDL複合体も、本発明スタンダード2の成分として採用することができる。

また、本発明スタンダード2の成分である「oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、
10 pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL複合体」は、以下の(a)及び(b)の性質を有するものが好ましい。

(a) 100単位/mlのヘパリンを共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。

(b) 10mMのMgCl₂を共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的
15 に解離しない。

上記(a)及び(b)の性質を有する β 2-GPI-oxLDL複合体は、少なくとも、oxLDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得ることができる。しかし前記した通り、本発明スタンダード2の成分として用いることができる β 2-GPI-oxLDL複合体は、この方法によって実際に得
20 られた物に限定されるわけではなく、これと異なる方法によって得られた複合体であっても良い。

本発明スタンダード2は、このような β 2-GPI-oxLDL複合体を、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体を測定するためのスタンダードとしたものである。

本発明スタンダード2は、このような β 2-GPI-oxLDL複合体を成分とする限り
25 においてさらに他の成分を含んでいてもよい点、「他の成分」として用いることができるものについての説明や例示等は、前記の「本発明スタンダード1」における説明と同様である。

また、本発明スタンダード2の形態等に関する説明等も、前記の「本発明スタンダード1」における説明と同様である。

本発明スタンダードを用いた測定に付される検体は、 β 2-GPI-oxLDL複合体の測定が必要とされているものであれば特に限定されない。また検体は、 β 2-GPI-oxLDL複合体について精製されていなくてもよい。検体としては生体由来のものが好ましく、生体由来の検体として具体的には、血液（本明細書では、血清及び
5 血漿を含む概念として用いる）等が例示される。血液をそのまま用いてもよく、これを希釈したものや、サンプル中の β 2-GPI-oxLDL複合体に影響を与えない限りにおいてこれを加工したものであってもよい。

< 2 > 本発明測定方法 1

本発明測定方法 1 は、本発明スタンダードを用いることを特徴とする、検体中
10 の β 2-GPI-oxLDL複合体の測定方法である。

ここにいう「本発明スタンダード」は、本発明スタンダード 1 であっても 2 であってもよい。これらの説明は前記の通りである。

本発明測定方法 1 は、本発明スタンダードを用いる限りにおいて、その具体的な方法は限定されない。具体的な方法の一例として、例えば抗体を用いた免疫学的な測定手法（E L I S A 法（サンドイッチ法、競合法、阻害法等）、イムノブ
15 ロットティング、凝集法等）が例示される。

生体内に存在する β 2-GPI-oxLDL複合体におけるoxLDLと β 2-GPIとの結合の大部分は共有結合、又は少なくとも静電的な結合力を上回る強い結合を形成していること、及び静電的な結合をしているものも多量存在していることが本発明者
20 によって見出されている。そして共有結合している複合体と、静電的な結合をしている複合体とでは、物理化学的性質や生物学的性質（例えば抗原性等）が若干異なることが、本発明者により確認されている。

したがって、検体中に存在する「静電的な結合により形成されている β 2-GPI-oxLDL複合体」におけるoxLDLと β 2-GPIとを、予め全て共有結合させておけば、
25 検体中に存在する全ての複合体（共有結合したもの、及び静電的な結合をしたもの）を、より正確に測定することができる点で好ましい。すなわち本発明測定方法 1 は、検体中の「oxLDL」と「 β 2-GPI」とを共有結合させるステップを少なくとも含むことが好ましい。共有結合させる方法についての説明は、前記の「本発明スタンダード 1」における説明と同様である。

また、前記の「本発明スタンダード2」で説明した通り、oxLDLと β 2-GPIとをpH7.4のようなpH3~9の条件下でインキュベートすることによって、oxLDLと β 2-GPIとの間に、下記(a)及び(b)の性質を有する結合を形成させることができる。

- 5 (a) 100単位/mlのヘパリンを共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。

(b) 10mMのMgCl₂を共存させても、複合体を構成するoxLDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。

- したがって、検体中に存在する「静電的な結合により形成されている β 2-GPI-oxLDL複合体」を、予め全て上記(a)及び(b)の性質を有する結合にさせておけば、
10 検体中に存在する全ての複合体（上記(a)及び(b)の性質を有する結合をしたもの、及び静電的な結合をしたもの）を、より正確に測定することができる点で好ましい。すなわち本発明測定方法1は、検体中の「oxLDL」と「 β 2-GPI」とを、予めpH3~9の条件下でインキュベートするステップを少なくとも含むことが好ま
15 しい。具体的には、pH7.4程度を例示することができる。

なお、上記(a)及び(b)の性質を有する結合は、Schiff（シッフ）塩基の形成によるものと考えられ、この反応は酸触媒で進行する。従って、インキュベート時のpHは中性~酸性であることが好ましい。ただし、強酸性条件下ではタンパク質の変性が起こることから好ましくない。

- 20 インキュベート時の温度は、oxLDLや β 2-GPIの機能を喪失しない程度である限りにおいて特に限定されないが、例えば37℃程度が例示される。また、インキュベートの時間も特に限定されず、当業者が適宜設定することができる。一般にインキュベート時間が長いほど、前記の結合をより完全に形成させることができる。

- 25 また、検体中に存在する「静電的な結合により形成されている β 2-GPI-oxLDL複合体」におけるoxLDLと β 2-GPIとを、予め全て解離させておけば、検体中に存在する、共有結合又は前記(a)及び(b)の性質を有する結合をした複合体のみを、より正確に測定することができる点で好ましい。すなわち本発明測定方法1は、検体中の「『oxLDL』と『タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、アミノ糖又は

- アミノ脂質』とが静電的に結合した複合体」を解離させるステップを少なくとも含むことが好ましい。解離させる方法・条件等については、静電的に結合した複合体のみを解離し、共有結合又は前記(a)及び(b)の性質を有する結合をした複合体を解離しないものである限りにおいて特に限定されないが、ヘパリンや、
- 5 MgCl₂、CaCl₂等の塩の存在下で複合体をインキュベートする方法が例示される。これらの物質の濃度、インキュベート時の温度、インキュベートの時間等は、静電的に結合した複合体のみを解離し、共有結合又は前記(a)及び(b)の性質を有する結合をした複合体を解離しない範囲において、当業者が適宜設定することができる。例えば、インキュベートの温度としては37℃程度が例示される。また
- 10 インキュベートの時間は、一般に長いほど前記の複合体の成分をより完全に解離することができる。

なお、「検体」の意義については、「本発明スタンダード」における説明と同様である。

< 3 > 本発明検出方法 1

- 15 本発明検出方法 1 は、本発明測定方法 1 を用いて検体中の β 2-GPI-oxLDL 複合体を測定し、測定された「検体中の当該複合体」と疾患とを関連づけることを特徴とする、疾患の検出方法である。

- 本発明検出方法 1 においては、まず本発明測定方法 1 によって検体中の β 2-GPI-oxLDL 複合体を測定する。本発明測定方法 1 についての説明は前記の通りである。ここで用いる「検体」は、疾患の検出対象となる動物の生体由来のものである限りにおいて特に限定されず、具体的には、血液等が例示される。「検体」に関するその他の説明は、前記の「本発明スタンダード」における説明と同様である。
- 20

- 本発明検出方法 1 においては、次いで、本発明測定方法 1 を用いて測定された
- 25 「検体中の β 2-GPI-oxLDL 複合体」と疾患とを関連づけることにより疾患を検出する。

前記の通り、本明細書における「測定」との用語は、定量的な測定のみならず、定性的な検出（存否の検出）をも含む概念である。したがって、ここにいう「測定された『検体中の β 2-GPI-oxLDL 複合体』」は、検体中の当該複合体の「量」

(定量的な測定結果)であっても「存否」(定性的な測定結果)であってもよい。また「量」については、濃度既知の本発明スタンダードを用いて作成した検量線や関係式等から求めた量(実測値)であっても良く、健常動物(疾患に罹患していない動物)に対する比(相対値)であっても良い。

- 5 そして、 β 2-GPI-oxLDL複合体の量はある種の疾患によって増加することから、検体中の当該複合体量が健常人のそれに比して多い場合には、「疾患に罹患している」もしくは「疾患に罹患している可能性が高い」と関連づけることができる。検体中の当該複合体量が健常人のそれと同等であれば、「疾患に罹患していない」もしくは「疾患に罹患している可能性は低い」と関連づけることができる。
- 10 また本発明検出方法1は、疾患への罹患の有無のみでなく、罹患の程度の検出も含まれる。例えば、ある個人の検体中の当該複合体量を定期的に測定し、当該複合体量が増加傾向にある場合には「疾患が進行している」もしくは「疾患が進行している可能性が高い」と関連づけることができる。逆に、測定された当該複合体量が減少傾向にある場合には、「疾患が改善方向にある」もしくは「疾患が
- 15 改善方向にある可能性が高い」と関連づけることができる。また測定された当該複合体量に変化がない場合には、「疾患の程度(または健常性)に変化がない」もしくは「疾患の程度(または健常性)に変化がない可能性が高い」と関連づけることができる。

- 本発明検出方法1によって検出される「疾患」は、A P S、血栓症、動脈血栓
- 20 症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化(脳梗塞、心筋梗塞など)及び糖尿病からなる群から選ばれるものが好ましい。

<4>本発明キット1

- 本発明キット1は、本発明スタンダードを構成成分として含むことを特徴する、検体中の β 2-GPI-oxLDL複合体の測定キットである。ここにいう「本発明スタン
- 25 ダード」は、本発明スタンダード1であっても2であってもよい。これらの説明は前記の通りである。

また本発明キット1は、本発明スタンダードを構成成分として含んでいる限りにおいて、さらに他の構成成分を含んでいてもよい。なかでも「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」をさらに構成成分として含むものが好ましい。

「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」も特に限定されないが、例えば抗 β 2-GPI自己抗体であるWB-CAL-1(IgG2a, κ)や、マウスモノクローナル抗ヒトapoB100抗体である1 D 2 (IgG)等が例示される。

「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」は、標識物質で標識されていること
5 が、検出が容易となることから好ましい。

また、「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」自体が標識されていなくても、「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」に結合する物質が標識されていてもよい。

このような標識に使用される標識物質としては、酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等）、蛍光色素（フルオレセインイソチオシアネート（FITC）など）、化学発光物質（ルミノールなど）、ビオチン、アビジン（ストレプトアビジンを含む）等が挙げられるが、通常タンパク質の標識に可能なものであれば、特に限定されない。標識方法は、標識物質に適した公知の方法、例えば、
10 グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸架橋法、マレイミド架橋法、カルボジイミド法、活性化エステル法等〔「タンパク質の化学（下）」、東京化学同人、1987年発行参照〕等から適宜選択することができる。例えば標識物質としてビオチンを使用する場合は、ビオチンのヒドラジド誘導体を用いる方法（Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook, p57-63,
15 PIERCE CHEMICAL COMPANY, 1994年発行参照）、またフルオレセインイソチオシアネートを使用する場合は特公昭63-17843号公報記載の方法等から適宜選択できる。

また標識物質の検出は、用いた標識物質に応じて当業者が適宜検出方法を選択することができる。例えば、標識物質としてペルオキシダーゼを使用した場合には、当該酵素の基質としてテトラメチルベンジジン、0-フェニレンジアミン等の
25 発色基質および過酸化水素水を加え、酵素反応による生成物の発色の度合いを吸光度の変化で測定することにより検出を行うことができる。また、蛍光物質や化学発光物質を使用する場合には、反応後の溶液の蛍光や発光を測定する方法等が挙げられる。

本発明キット 1 に加えうる他の構成成分としては、標識物質の検出試薬、「 β 2-GPI-oxLDL 複合体を認識する抗体」を標識する試薬等を例示することができる。これらの構成成分の他に、ブロッキング物質、洗浄液、検体希釈液、酵素反応停止液等を含んでいてもよい。

- 5 これらの構成成分は、それぞれ別体の容器に収容しておき、使用時に本発明測定方法 1 に従って使えるキットとして保存しておくことができる。

本発明キット 1 を用いた β 2-GPI-oxLDL 複合体の測定は、本発明測定方法 1 に従って行うことができる。

- また本発明キット 1 は、疾患の検出に用いられるものが好ましい。本発明キット 1 を用いて検出される「疾患」は、AP S、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化（脳梗塞、心筋梗塞など）及び糖尿病からなる群から選ばれるものが好ましい。本発明キット 1 を用いた疾患の検出は、本発明検出方法 1 に従って行うことができる。

- ここで用いる「検体」は、疾患の検出対象となる動物の生体由来のものである
15 限りにおいて特に限定されず、具体的には、血液等が例示される。「検体」に関するその他の説明は、前記の「本発明スタンダード」における説明と同様である。

< 5 > 本発明抗原

< 5 > - 1 本発明抗原 1

- 本発明抗原 1 は、「oxLDL と β 2-GPI とが共有結合した複合体」を成分とする、
20 検体中の「 β 2-GPI-oxLDL 複合体を認識する抗体」を測定するための抗原である。

- 本発明抗原 1 の成分である「oxLDL と β 2-GPI とが共有結合した複合体」についての説明は、前記の「本発明スタンダード 1」における説明と同様である。また、本発明抗原 1 はこのような β 2-GPI-oxLDL 複合体を成分とする限りにおいてさらに他の成分を含んでいてもよい点、「他の成分」として用いることができるもの
25 についての説明や例示等も、前記の「本発明スタンダード 1」における説明と同様である。

また、本発明抗原 1 の形態等に関する説明等も、前記の「本発明スタンダード 1」における説明と同様である。また「検体」の意義についても、「本発明スタンダード」における説明と同様である。

< 5 > - 2 本発明抗原 2

本発明抗原 2 は、「oxLDL と β 2-GPI とを、37℃、pH 7.4 の条件下で 16 時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL 複合体」を成分とする、検体中の「 β 2-GPI-oxLDL 複合体を認識する抗体」を測定するための抗原である。

本発明抗原 2 の成分である「oxLDL と β 2-GPI とを、37℃、pH 7.4 の条件下で 16 時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL 複合体」についての説明は、前記の「本発明スタンダード 2」における説明と同様である。したがって、本発明抗原 2 における「oxLDL と β 2-GPI とを、37℃、pH 7.4 の条件下で 16 時間インキュベートすることによって得られうる β 2-GPI-oxLDL 複合体」は、以下の (a) 及び (b) の性質を有するものが好ましい。

(a) 100 単位/ml のヘパリンを共存させても、複合体を構成する oxLDL と β 2-GPI とが実質的に解離しない。

(b) 10mM の $MgCl_2$ を共存させても、複合体を構成する oxLDL と β 2-GPI とが実質的に解離しない。

上記 (a) 及び (b) の性質を有する β 2-GPI-oxLDL 複合体の製造方法についても、前記の「本発明スタンダード 2」における説明と同様である。

また、本発明抗原 2 はこのような β 2-GPI-oxLDL 複合体を成分とする限りにおいてさらに他の成分を含んでいてもよい点、「他の成分」として用いることができるものについての説明や例示等は、前記の「本発明スタンダード 1」における説明と同様である。

また、本発明抗原 2 の形態等に関する説明等も、前記の「本発明スタンダード 1」における説明と同様である。また「検体」の意義についても、「本発明スタンダード」における説明と同様である。

本発明抗原を用いた測定の対象となる「 β 2-GPI-oxLDL 複合体を認識する抗体」は特に限定されないが、自己抗体や、本発明キット 1 で説明した抗体等が例示される。

本発明抗原は、いずれも「 β 2-GPI-oxLDL 複合体を認識する抗体」と結合することから、この特性を利用して「 β 2-GPI-oxLDL 複合体を認識する抗体」の測定

に用いることができる。

< 6 > 本発明測定方法 2

本発明測定方法 2 は、本発明抗原を用いることを特徴とする、検体中の「 $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の測定方法である。

- 5 ここにいう「本発明抗原」は、本発明抗原 1 であっても 2 であってもよい。これらの説明は前記の通りである。

- 本発明測定方法 2 は、本発明抗原を用いる限りにおいて、その具体的な方法は限定されない。具体的な方法の例については、前記の「本発明測定方法 1」における例と同様である。ただし本発明測定方法 2 においては、本発明抗原を固相に
- 10 固着させて用いることが好ましい。すなわち本発明測定方法 2 は、後述の「本発明固相」を用いた方法であることが好ましい。

「検体」の意義については、「本発明スタンダード」における説明と同様である。また「 $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」については、前記の「本発明抗原」における説明と同様である。

15 < 7 > 本発明検出方法 2

本発明検出方法 2 は、本発明測定方法 2 を用いて検体中の「 $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」を測定し、測定された「検体中の当該抗体」と疾患とを関連づけることを特徴とする、疾患の検出方法である。

- 本発明検出方法 2 においては、まず本発明測定方法 2 によって検体中の「 $\beta 2$ -
- 20 GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」を測定する。本発明測定方法 2 についての説明は前記の通りである。ここで用いる「検体」は、疾患の検出対象となる動物の生体由来のものである限りにおいて特に限定されず、具体的には、血液等が例示される。「検体」に関するその他の説明は、前記の「本発明スタンダード」における説明と同様である。

- 25 本発明検出方法 2 においては、次いで、本発明測定方法 2 を用いて測定された「検体中の $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」と疾患とを関連づけることにより疾患を検出する。

ここにいう「測定された『検体中の $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体』」とは、前記の「本発明検出方法 1」における説明と同様に、検体中の当該抗体の

「量」（定量的な測定結果）であっても「存否」（定性的な測定結果）であってもよい。

また「量」が、実測値であっても相対値であっても良い点についても、前記の「本発明検出方法 1」における説明と同様である。

- 5 「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の量はある種の疾患によって増加することから、検体中の当該抗体量が健常人のそれに比して多い場合には、「疾患に罹患している」もしくは「疾患に罹患している可能性が高い」と関連づけることができる。検体中の当該抗体量が健常人のそれと同等であれば、「疾患に罹患していない」もしくは「疾患に罹患している可能性は低い」と関連づけることができる。
- 10

- 本発明検出方法 2 が、疾患への罹患の有無のみでなく、罹患の程度の検出も含まれる点、及び、本発明検出方法 2 によって検出される「疾患」が、A P S、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化（脳梗塞、心筋梗塞など）及び糖尿病からなる群から選ばれるものが好ましい点についても、本発明
- 15 明検出方法 1 と同様である。

< 8 > 本発明固相

本発明固相は、本発明抗原が固着された固相である。

ここにいう「本発明抗原」は、本発明抗原 1 であっても 2 であってもよい。これらの説明は前記の通りである。

- 20 本発明抗原を固着するために用いる固相は、本発明抗原を固着させることができ、かつ、水、検体または測定反応液に不溶性である限りにおいて特に限定されない。固相の形状としては、プレート（例えばマイクロプレートのウェル等）、チューブ、ビーズ、メンブレン、ゲル等を例示することができる。固相の材質としては、ポリスチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリアクリルアミド等が例
- 25 示される。

これらの中でも、ポリスチレンを材質としたプレートが好ましい。

これらの固相に本発明抗原を固着させる方法としては、物理的吸着法、共有結合法等、タンパク質や脂質の一般的な固着方法を利用することができる。

これらの中でも、物理的吸着法が、操作が簡便かつ頻用されていることから好

ましい。

物理的吸着法として具体的には、例えば本発明抗原を緩衝液等に溶解し、この溶液を固相（例えばマイクロプレート）に接触させることによって、本発明抗原を固相に吸着させる方法を挙げることができる。

- 5 また、本発明抗原を固着させた固相の表面には、これらが固着していない表面部分が残存している場合があり、そこに検体中の「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」や他の分子種が固着すると正確な測定結果が得られなくなるおそれがある。よって、検体を固相と接触させる前にブロッキング物質を添加して本発明抗原が固着していない部分を被覆しておくことが好ましい。このようなブロッキング物質としては、血清アルブミン、カゼイン、スキムミルク、ゼラチン等が挙げられ、また、ブロッキング物質として市販されているものを使用することもできる。
- 10

- ブロッキングの方法として具体的には、例えばブロッキング物質（血清アルブミン、カゼイン、スキムミルク、ゼラチン等）を添加して、37℃程度で30分
- 15 ～2時間保存するか、常温（15～25℃）で1～2時間保存する方法を挙げることができる。

<9>本発明キット2

本発明キット2は、本発明固相を構成成分として含むことを特徴する、検体中の「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の測定キットである。

- 20 また本発明キット2は、本発明固相を構成成分として含んでいる限りにおいて、さらに他の構成成分を含んでいてもよい。なかでも「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」に結合する物質をさらに構成成分として含むものが好ましい。

- 「『 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体』に結合する物質」は、「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」に結合するものである限りにおいて特に限定されないが、「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」（免疫グロブリン）が由来する動物又はクラス等に応じた、その免疫グロブリンに特異的に結合する抗体等が例示される。例えば「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」がマウス由来のIgG1である場合には、「『 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体』に結合する物質」として抗マウスIgG1抗体を用いることができる。
- 25

このような「『 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体』に結合する物質」は、標識物質で標識されていることが、検出が容易となることから好ましい。

また、「『 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体』に結合する物質」自体が標識されていなくても、「『 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体』に結合する物質」に結合する物質が標識されていてもよい。

このような標識に使用される標識物質の説明、及び標識物質の検出についての説明は、前記の「本発明キット 1」における説明と同様である。

本発明キット 2 に加えうる他の構成成分としては、標識物質の検出試薬、「『 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体』に結合する物質」を標識する試薬等を例示することができる。これらの構成成分の他に、ブロッキング物質、洗浄液、検体希釈液、酵素反応停止液等を含んでいてもよい。

これらの構成成分は、それぞれ別体の容器に収容しておき、使用時に本発明測定方法 2 に従って使えるキットとして保存しておくことができる。

また本発明キット 2 を用いた「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の測定は、本発明測定方法 2 に従って行うことができる。

また本発明キット 2 は、疾患の検出に用いられるものが好ましい。本発明キット 2 を用いて検出される「疾患」が、A P S、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化（脳梗塞、心筋梗塞など）及び糖尿病からなる群から選ばれるものが好ましい点については、前記の「本発明キット 1」と同様である。

また本発明キット 2 を用いた疾患の検出は、本発明検出方法 2 に従って行うことができる。

ここで用いる「検体」は、疾患の検出対象となる動物の生体由来のものである限りにおいて特に限定されず、具体的には、血液等が例示される。「検体」に関するその他の説明は、前記の「本発明スタンダード」における説明と同様である。

< 10 > 本発明測定方法 3

本発明測定方法 3 は、「 β 2-GPI を認識する抗体」及び／又は「LDL を認識する抗体」、並びに抗 Ig G 抗体を用いることを特徴とする、検体中の免疫複合体の測定方法である。

本発明測定方法 3 により、 β 2-GPI 又は LDL と共に形成された IgG 免疫複合体を検出することができる。

「 β 2-GPI を認識する抗体」は特に限定されないが、Cof-23 が好ましい。また「LDL を認識する抗体」も特に限定されないが、抗 apoB100 抗体 (1D2) が
5 好ましい。また「抗 IgG 抗体」も特に限定されず、免疫複合体を構成する IgG (免疫グロブリン G) が由来する動物又はクラス等に応じた、その IgG に特異的に結合する抗体が例示される。例えば免疫複合体を構成する IgG がヒト由来である場合には、抗 IgG 抗体として抗ヒト IgG 抗体を用いることができる。

これらの抗体は、固相に固着されたものが好ましい。ここで用いることができる固相は、前記の「本発明固相」と同様である。また「検体」の意義については、
10 「本発明スタンダード」における説明と同様である。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。なお、本実施例中の [] 内の数字は、後述の引用文献の番号を示す。

15 まず、本実施例で用いた材料や方法を説明する。

(1) モノクローナル抗体

Cof-22 (IgG1, κ) 及び Cof-23 (IgG1, κ) : 抗ヒト β 2-GPI 抗体である。ヒト β 2-GPI で免疫した BALB/c マウスから確立された抗体である [文献 2]。いずれも溶液中でモノメリックな β 2-GPI に結合する。

20 WB-CAL-1 (IgG2a, κ) : 抗 β 2-GPI 自己抗体である。WB F1 マウス由来の抗体である [文献 8]。

EY2C9 (IgM) : 抗 β 2-GPI 自己抗体である。APS 患者の末梢血リンパ球から確立された抗体である [文献 9]。

WB-CAL-1 及び EY2C9 は、いずれも「陰性に荷電した PLs と複合体を形成した
25 β 2-GPI」又は「oxLDL と複合体を形成した β 2-GPI」にのみ結合し、溶液中でモノメリックな β 2-GPI には結合しない。

1D2 (IgG) : マウスモノクローナル抗ヒト apoB100 抗体である。oxLDL とネイティブな LDL のいずれにも結合する。ヤマサ醤油株式会社より入手した。

(2) ヒト β 2-GPI の調製

β 2-GPIは、健常人の血漿から[文献10]に記載の方法に準じて精製した。プールした健常人の血漿は、ヘパリン-セファロースカラム、DEAE-セルロースカラム、及び抗 β 2-GPIアフィニティークラムを用いて精製した。種々のIgGによるコンタミネーションを除去するために、 β 2-GPIリッチな画分をさらに
5 プロテインA-セファロースカラムに通した。最終的な β 2-GPI画分は、n-ブタノールで十分に洗浄することによって脱脂した。

(3) LDLの単離及び酸化

LDL ($d=1.019\sim 1.063$ g/ml) は、[文献11]に記載の方法に従って、新鮮な健常人血漿を超速心することによって単離した。単離したLDLを 100μ g/ml
10 に調整し、 5μ M CuSO_4 (10mM Hepes、150mM NaCl、pH7.4 (Hepes緩衝液)) とともに 37°C で種々の時間インキュベートすることによって酸化した。EDTA (終濃度 1mM) を添加することによって酸化を停止させ、このLDLを1mM EDTAを含有するHepes緩衝液に対して透析した。酸化の程度はチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 値[文献12]によって評価した。

15 (4) 9-カルボキシノナノエートのオキシステロール誘導体の合成

7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート (oxLig-1) は、[文献7]に記載の方法によって合成した。22-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート (9-COOH-22KC) も同様に合成した。すなわち、22-ケトコレステロール (22-ketocholesterol ; 10mg、0.025mmol) とアゼライン酸 (azelaic acid ; 14.1mg、
20 0.075mmol) のアセトン溶液 (1ml) に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride ; 19.2mg、0.10mmol) および4-(ジメチルアミノ) ピリジン (4-(dimethylamino)pyridine ; 6.1mg、0.80mmol) を添加した。混合液を室温で2日間攪拌し、濃縮して、クロロホルム
25 で抽出した。抽出物を2M塩酸で連続的に洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、蒸発させた。残存物を、トルエン/酢酸エチル (3/1、v/v) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにアプライし9-COOH-22KCを得た (8.5mg、収率 61%)。 ^1H NMRで解析した結果は次の通りであった。

^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ = 5.35(d, ^1H , J 5.1Hz, H-6), 4.59(m, ^1H , H-

3)

oxLig-1と同様に、9-COOH-22KCの ^1H NMRスペクトルは、H-3のシグナルが $\delta = 4.59\text{ppm}$ の位置に多重として検出された。この結果は、この位置のヒドロキシル基がエステル化されていることを示唆している。スペクトルが、より低い磁気領域 (magnetic field) におけるH-6のオレフィンのプロトンのシグナルをも示すにもかかわらず、スピンスピン・カップリングは隣接するメチレン基の間に観察された。9-COOH-22KCの分子量は、oxLig-1と同一であった。9-COOH-22KCはリーベルマン-ブルヒアルト反応 (Lieberman-Burchard反応) に陽性であり、7位の結合ケトンが存在しないことが示された。

10 (5) 薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート上でのリガンドブロット分析

TLCリガンドブロットを行うために、脂質をポリグラム・シリカゲルG プレート (Polygram silica gel G plate; Machery-Nagel社製) にスポットし、クロロホルム/メタノール (8/1, v/v) で展開した。リガンドブロット分析は、[文献7]に記載の方法によって行った。すなわち、プレートを乾燥させ、1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含有するPBSでブロッキングした後、そのプレートを β 2-GPI及び抗 β 2-GPI抗体 (Cof-22及びEY2C9) とともに1時間インキュベートした。次いで、そのプレートを西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識した抗マウスIgG抗体または抗ヒトIgM抗体で1時間インキュベートした。それぞれのステップの間で、プレートをPBSで十分に洗浄した。

20 発色は H_2O_2 と4-メトキシ-1-ナフトール (4-methoxy-1-naphtol) を用いて行った。コントロールのTLCプレートにおいては、分離したリガンドを I_2 の噴霧 (I_2 vapor) で染色した。

(6) β 2-GPI-oxLDL複合体を検出するためのELISA

抗 β 2-GPI抗体 (WB-CAL-1) は、その $8\mu\text{g/ml}$ 溶液 (Hepes緩衝液に溶解したもの ; $50\mu\text{l}$ /ウェル) をマイクロタイタープレート (Immulon 2HB, Dynex Technologies Inc.) に入れて 4°C で一晩インキュベートすることによって吸着させた。このプレートを1%スキムミルクで1時間ブロッキングした。血清サンプル (100倍希釈したもの) または β 2-GPI-oxLDL複合体若しくはoxLDLを含有する溶液をウェルに添加し ($100\mu\text{l}$ /ウェル) 、2時間インキュベートした。いく

つかの実験については、このステップにおいて外来性の β 2-GPIを存在させた
(25 μ g/ml)。次いで、ウエルをビオチン標識した抗apoB100抗体(1 D 2)と
共に1時間インキュベートし、HRP標識したアビジンで30分間インキュベ
ートした。発色は、 α -フェニレンジアミンおよび H_2O_2 を用いて行った。発色
5 反応を2Nの硫酸を添加することによって停止させ、490nmのODを測定した。
これらのステップの間で、0.05% Tween 20を含有するHepes緩衝液で
十分に洗浄した。個々のアッセイにおけるサンプルの吸光度(OD)をブラン
クのウエルにおける平均ODで補正した。1.0ユニット/mlを、50人の健常人の
血清サンプルの平均値の標準偏差の3倍となるように調整した結果、1.0ユニ
10 ト/mlのoxLDL12h- β 2-GPI16h複合体は、apoBで約4.5 μ g/mlに相当した。反応
性が1.0ユニット/mlを上回ったサンプルを陽性とした。

(7) 抗 β 2-GPI-脂質 IgG抗体を検出するためのELISA

CL(ウシ心臓由来; シグマ社製)、oxLig-1又は9-COOH-22KC(50 μ g/mlエタ
ノール、50 μ l/ウエル)をエバポレーションによってポリスチレンプレート
15 (Immulon 1B; Dynex Technologies Inc.)に吸着させ、このプレートを1% B
SAでブロックした。ウエル中で、精製したモノクローナル自己抗体又は血清サ
ンプル(100倍希釈したもの)を β 2-GPI(25 μ g/ml)の存在下又は非存在下で1時
間インキュベートし、次いでHRP標識した抗マウスIgG又は抗ヒトIgG若
しくはIgMを添加した。

20 その後のステップは「 β 2-GPI-oxLDL複合体を検出するためのELISA」に
記載された方法で行った。個々のサンプルの吸光度(OD)をブランクのウエル
における平均ODで補正し、その抗体価を体内の陽性スタンダードで算出した。
サンプル中の抗体価が、50人の健常人の血漿サンプル中の平均値の標準偏差の
3倍を上回る場合に陽性とした。

25 (8) 抗 β 2-GPI IgG抗体を検出するためのELISA

抗 β 2-GPI IgG抗体を検出するためのELISAは、[文献1]に記載の方法に
よって行った。すなわち、 β 2-GPIをポリ酸化化したポリスチレンプレート(カ
ルボキシル化、Sumilon C、住友ベークライト社(Sumitomo Bakelite Co.,
Ltd.))に10 μ g/ml(50 μ l/ウエル)入れて、4℃で一晩インキュベートするこ

とによって吸着させ、このプレートを3%ゼラチンを用いてブロッキングした。血清サンプルを100倍希釈し、ウェル中で1時間インキュベートした。次いでHRP標識した抗ヒトIgGをプレートに添加した。その後のステップは「 β 2-GPI-oxLDL複合体を検出するためのELISA」に記載された方法で行った。

5 (9) IgG免疫複合体を検出するためのELISA

β 2-GPI又はLDLと共に形成されたIgG免疫複合体を検出するために、抗 β 2-GPI抗体(Cof-23)又は抗apoB100抗体(1D2)を、ポリスチレンプレート(Immulon 1B)にそれぞれ5 μ g/ml (50 μ l/ウェル)入れ、4℃で一晩インキュベートすることによって吸着させた。次いでプレートを1%BSAでブロックした。血清サンプル(100倍希釈したもの)をウェル中で1時間インキュベートし、次いでHRP標識した抗ヒトIgGを添加した。その後のステップは「 β 2-GPI-oxLDL複合体を検出するためのELISA」に記載された方法で行った。

(10) 「 β 2-GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」を検出するためのELISA
oxLDL12h- β 2-GPI16h複合体(10ug/ml、50ug/ウェル)をポリスチレンプレート(Immulon 1B)のウェル中で4℃、一晩インキュベートした後、1%BSAを含有するPBSでブロッキングした。次いで0.3%BSAを含有するPBSで100倍希釈した血清サンプルをウェルに入れ、1時間反応させた後、HRP標識した抗ヒトIgGで1時間反応させた。常法の通り、*o*-フェニレンジアミンおよびH₂O₂を加えて発色させ、硫酸で反応を停止した後、490nmの吸光度を測定した。

20 (11) 統計解析

統計解析は、StatViewソフトウェア(Abacus Concepts社)を用いて行った。自己抗体と臨床履歴を比較する場合には、Fisher's exact検定を用いた。信頼率95%の信頼区間(C.I.)は、Woolfの方法によって算出した。

(12) 血清サンプル

25 本実施例で用いた血清サンプルが由来する患者の構成を表1に示す。

表 1

		No	%
5	患者		
	SLEのみ	44	
	APS	83	
	原発性	46	55.4
	SLE合併	37	44.6
10	臨床履歴		
	血栓症	71	55.9
	動脈血栓症のみ	26	20.5
	静脈血栓症のみ	27	21.3
	動脈あるいは静脈血栓症	18	14.2
	習慣流産	31 / 116	26.7
	血小板減少	23 / 123	18.7
15	自己抗体		
	β 2-GPI 依存性 IgG aCL (抗 β 2-GPI-CL IgG 抗体)	73 / 127	57.5
	抗 β 2-GPI IgG 抗体	46 / 127	36.2
	抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG 抗体	60 / 127	47.2
	Lupus anticoagulants	59 / 108	54.6
	β 2-GPI-oxLDL 複合体	72 / 127	56.7

結果

20 (1) β 2-GPI結合リガンドとしての7-ケトンの役割

ケトンの位置が異なる2つの ω -カルボキシルオキシステロールエステルの変異体(7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート(7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate; oxLig-1)及び22-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート(22-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate; 9-COOH-22KC)の β 2-GPIに対する結合を比較するため、抗 β 2-GPI抗体をプローブとして用いたリガンドプロット及びELISAを行った。Cof-22抗体及びEY2C9抗体を用いて検出したリガンドプロットにおいては、 β 2-GPIは7-ケト変異体(oxLig-1)に優先的に結合し、9-COOH-22KCには結合しなかった(図1)。リガンドをコートしたプレートを用いたELISAにおいて、抗 β 2-GPI抗体(Cof-

22、WB-CAL-1又はEY2C9)を用いて検出した結果、 β 2-GPIは、固相化された9-COOH-22KCよりも、固相化されたoxLig-1により強く結合した(表2)。これらのデータは、コレステロール骨格の7位のケトンが、 β 2-GPIとそのリガンドである「 Cu^{2+} -oxLDLに由来するoxLig-1」との間の高親和性の相互作用に必須の決定基であることを示している。

5

10

15

20

25

表 2

固相化した脂質	$\beta 2$ -GPI 結合 (OD)	
	w/ Cof-22	w/ WB-CAL-1 w/ EY2C9
oxLig-1	1.194 \pm 0.099 (0.041 \pm 0.001)	0.441 \pm 0.007 (0.013 \pm 0.004) 0.878 \pm 0.031 (0.013 \pm 0.001)
9-COOH-22KC	0.217 \pm 0.016 (0.067 \pm 0.013)	0.063 \pm 0.004 (0.031 \pm 0.011) 0.130 \pm 0.024 (0.046 \pm 0.008)

(2) $\beta 2$ -GPIと「 Cu^{2+} を介する酸化を受けたLDL」との相互作用

LDL (100 μ g/ml) を、5 μ MのCuSO₄とともに37℃で12時間インキュベートすることによって酸化し（これによって得られたoxLDLを「oxLDL12h」という）、EDTAを添加することによって酸化を停止させた。 β 2-GPI-oxLDL複合体を検出するELISAによって調べた結果、ウェル中でoxLDL12hを外来性の β 2-GPIとインキュベートした場合に限ってODが増加した。複合体の形成は、 β 2-GPIとoxLDLの両方の濃度に依存した（図2A、B）。有意な複合体形成は、oxLDL12hを用いた場合にのみ起こり、ネイティブなLDLでは起こらなかった。pH7.4における複合体形成は、ヘパリン又はMgCl₂の存在下でほぼ完全にうち消された（図2C）。この阻害は、CaCl₂の存在下においても同様に観察された（データは示さない）。これらのデータから、 β 2-GPIは、oxLDL12hと、まず解離可能な非共有的な複合体を形成しうることが示された。これに対して、oxLDL12hを β 2-GPIとともにpH7.4、37℃で16時間インキュベートすると、oxLDLと β 2-GPIとの比較的安定な複合体が一致して観察された（oxLDL12h- β 2-GPI16h）。ヘパリン又はMgCl₂をpH7.4の下で添加しても、oxLDL12h- β 2-GPI16hの複合体形成を崩壊させることはできなかった（図2D）。

このプロセスをさらに調べるために、種々の経時的な実験を行った。図3Aは、CuSO₄処理したLDLにおける、TBARSの時間に依存した生成を示す図である。37℃でCu²⁺イオンに暴露したLDL調製物では速やかにTBARSが生成し、そのピークは4時間目で検出された。これに対し、 β 2-GPIとの結合を生じさせるLDLの酸化は、少し遅延して進行し、約12時間後に最高レベルに達した（図3B）。この複合体形成は、ヘパリン又はMgCl₂の添加によってほぼ完全に阻害された。これらのデータは、 β 2-GPIはCu²⁺-oxLDLに結合するが、「MDAで修飾されたLDL」には結合しないという従来[文献6]とも一致する。

予め形成されたoxLDL12hを、 β 2-GPIと共に4℃又は37℃条件下で、種々の時間インキュベートした（それぞれの終濃度は100 μ g/ml及び100 μ g/ml）（図3C）。 β 2-GPI-oxLDL複合体の形成は、温度及び時間に依存的であった。この複合体は、ヘパリン又はMgCl₂を添加して、pH7.4の条件下でインキュベートしても解離しなかった。図3Dは、 β 2-GPIとoxLDLとの間の安定な相互作用が、たとえば β 2-GPIの存在下であってもCu²⁺による酸化のプロセスの間に生成されるこ

とを示す図である。

(3) 種々のpHにおける、in vitroの β 2-GPI-oxLDL複合体の安定性

安定な複合体が中性pHにおいて出現し、これはおそらく β 2-GPIのリジン残基と ϵ -アミンと、 Cu^{2+} を介したoxLDL上で酸化的に生成したアルデヒドとの間に形成されたシッフ塩基付加物であると考えられる。これを確認するために、塩基性pH条件下で、非還元、又は NaCNBH_3 還元した複合体の安定性を解析した。図4に示す通り、 MgCl_2 の非存在下で、調べた範囲のpH条件下においては、還元化したoxLDL12h- β 2-GPI16h複合体の解離は観察されなかった。 MgCl_2 の存在下では、pH10において82%の非還元の複合体が解離し、69%の還元化した複合体が解離した。この現象は、その付加物がシッフ塩基ではないこと、又はシッフ塩基であったとしてもそれが NaCNBH_3 に接し得ない環境（例えば、疎水性ポケット）にあることを示している。

(4) 患者の血清中に存在する、解離できない β 2-GPI-oxLDL複合体

APS及び／又はSLE患者の血清サンプルを、高レベルの β 2-GPI-oxLDL複合体が存在するか否かについてスクリーニングした。 β 2-GPI-oxLDL複合体は、まず20個の血清サンプルから同定された。この群は、2.1~13.7ユニット/ml（平均濃度：4.48ユニット/ml（カットオフ値：1.0ユニット/ml））という高濃度の血清複合体を示した。図5に示すように、ネイティブなLDLは、 β 2-GPIとともに37℃で16時間インキュベートしても複合体を形成しなかった。これに対し、oxLDL12h- β 2-GPI16h複合体は、pH7.4の条件下で、ヘパリンや MgCl_2 が存在しても安定である。pH7.4における5つの血清サンプルにおいて検出されたoxLDL- β 2-GPI複合体においても、典型的な結合パターンが見られた。20の全てのサンプルにおいて、in vivoで形成された複合体は、中性pHにおいて、ヘパリンや MgCl_2 が存在していても安定であった（ヘパリン及び MgCl_2 の存在下におけるODは、コントロールの条件に対して、それぞれ121+/-25.1%及び128+/-13.6%であった）。血清サンプル中に存在する、前段階で形成した複合体は、 MgCl_2 とともにpH10、37℃で16時間インキュベーション（この条件は、in vitroで形成した複合体を解離させることができる）した後にも一貫して見られた（104+/-10.9%）（図4）これらのことから、解離不能な、共有的な付加物が、in vivoにおいて

β 2-GPIとoxLDLとの間に形成されていると考えられる。また、今回の実験で見られたin vitro付加物は、解離不能な複合体形成の中間産物であると考えられる。

(5) β 2-GPI-oxLDL複合体とその自己抗体の臨床的有意性

ELISAにおいて、apoB相当で10ng/ml～1.25 μ g/mlを範囲とするoxLDL12h- β 2-GPI16h複合体の見かけの検量線を作成した。このELISAは、用いたWB-CAL-1抗体がoxLDLと複合体を形成した β 2-GPIに高い特異性を有していることから、血清サンプル中に高濃度に存在する内在性の、かつ単量体の β 2-GPIによっては、影響を受けなかった。この実験では、 β 2-GPI-oxLDL複合体は、原発性のAPS、SLEを伴うAPS（第2期のAPS）及びAPSを伴わないSLEにおいて、それぞれ
58.7% (27/46)、54.1% (20/37) 及び56.8% (25/44) の患者で見られた（図6）。
さらに、慢性腎炎（腎臓生検により診断された）では18.6% (16/86) の患者においてこの複合体が陽性であった。

抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体は、原発性のAPS、SLEを伴うAPS（第2期のAPS）及びAPSを伴わないSLEにおいて、それぞれ71.7% (33/46)、59.5%
(22/37) 及び11.4% (5/44) の患者で見られた。

127人からなるこの群の患者における抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体の抗体価は、 β 2-GPI依存性IgG aCL及び抗 β 2-GPI IgG抗体のいずれの抗体価とも強く相関していた（相関係数 r^2 は、それぞれ0.69及び0.81）（図7）。図8に示す通り、「抗 β 2-GPI IgG抗体」と「 β 2-GPIを含有するIgG免疫複合体」との間
($r^2=0.50$)（図8A）；「抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体」と「 β 2-GPIを含有するIgG免疫複合体」との間（ $r^2=0.50$ ）（図8B）；及び「 β 2-GPIを含有するIgG免疫複合体」と「LDLを含有するIgG免疫複合体」との間（ $r^2=0.40$ ）（図8C）において、良好な相関性が見られた。しかしながら、 β 2-GPI-oxLDL複合体のレベルと、これらの抗体の抗体価との間に、良好な相関性は見
られなかった（データは示していない）。

これらの患者（127人のAPS及び／又はSLE患者）における抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体は、血栓症（動脈及び／又は静脈血栓症、動脈血栓症、及び静脈血栓症）や習慣流産（pregnancy morbidity）の履歴と有意な関連性が見られたが、血小板減少（thrombocytopenia）との間では見られなかった（表3）。動

脈血栓症におけるアッセイのp値（期待値）、オッズ比、及び95% CIは、静脈血栓症、習慣流産及び血小板減少におけるものよりも良好であった。全ての患者を、 β 2-GPI-oxLDL複合体陽性群と陰性群に分け、抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体を統計学的に解析した。その結果、 β 2-GPI-oxLDL複合体陽性群においては、抗

5 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体と、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症及び習慣流産との間で、強い相関性が見られた。最も高い相関性は、動脈血栓症において見られた。

表 3

被験者	Fischer's exact 検定(p)	オッズ比	95 % CI
(A) 血栓症 (動脈血栓症及び/又は静脈血栓症)			
患者 (全体、n=127)	1.7×10^{-7}	7.65	3.41-17.2
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陽性、n=72)	5.9×10^{-5}	8.21	2.79-24.2
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陰性、n=55)	0.0014	6.87	2.01-23.5
(B) 動脈血栓症			
患者 (全体、n=127)	6.9×10^{-7}	7.45	3.21-17.3
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陽性、n=72)	4.8×10^{-5}	10.2	2.98-34.7
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陰性、n=55)	0.0043	5.63	1.68-18.9
(C) 静脈血栓症			
患者 (全体、n=127)	0.026	2.23	1.06-4.68
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陽性、n=72)	0.066	2.37	0.89-6.29
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陰性、n=55)	0.20	1.93	0.61-6.14
(D) 習慣性流産			
患者 (全体、n=116)	0.0052	3.31	1.39-7.90
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陽性、n=69)	0.014	4.43	1.27-15.4
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陰性、n=47)	0.12	2.67	0.74-9.61
(E) 血小板減少症			
患者 (全体、n=123)	0.25	1.53	0.61-3.80
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陽性、n=70)	0.22	1.93	0.58-6.50
($\beta 2$ -GPI-oxLDL 陰性、n=53)	0.61	1.05	0.25-4.46

(6) 「 $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」の検出

血清中の「 $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」をELISAにより検出した。また「 $\beta 2$ -GPI-oxLDL複合体を認識する抗体」と「抗 $\beta 2$ -GPI IgG抗体」との関係調べた。結果を図9に示す。

考察

本発明者は、 Cu^{2+} によって生成するoxLDLへの $\beta 2\text{-GPI}$ 結合に関与する主要な脂質リガンドが、7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート (oxLig-1) のような ω -カルボキシル化された7-ケトコレステロールエステルであることを報告し、 ω -カルボキシル基が $\beta 2\text{-GPI}$ の認識に必須であることを示した[文献7]。

5 In vitroでの $\beta 2\text{-GPI}$ と Cu^{2+} -oxLDLとの相互作用は、初期の段階では Mg^{2+} 処理によって可逆的であるが、次第に解離のために Mg^{2+} と高いpHを必要とする、より安定な相互作用に発展する。これに対して、oxLDLと $\beta 2\text{-GPI}$ との安定な、かつ解離できない複合体が、APS及び／又はSLE患者の血清サンプル中に見出された。

10 さらに、これらの患者の血清から、LDLと $\beta 2\text{-GPI}$ とを含有するIgG免疫複合体が検出され、また、血清の $\beta 2\text{-GPI}$ -oxLDL複合体は動脈血栓症と関連することも示唆された。

泡沫細胞の形成は、初期のアテローム発生の特質とされており、LDLは泡沫細胞中に蓄積される脂質の主要なソースである。修飾されたLDLの、マクロファージのスカベンジャー受容体への結合は、調節されないコレステロールの蓄積に至り、アテローム硬化型の傷害の発生を伴う泡沫細胞の形成に至る。最近、私は Cu^{2+} -oxLDLへの $\beta 2\text{-GPI}$ 結合、及びマクロファージによる抗 $\beta 2\text{-GPI}$ 抗体を介するファゴサイトーシスを与える2つの主要なリガンドの構造を、7-ケトコレステリル-9-カルボキシノナノエート (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate ;

15 oxLig-1) 及び7-ケトコレステリル-12-カルボキシ (ケト) ドデカノエート (7-ketocholesteryl-12-carboxy (keto) dodecanoate ; oxLig-2) と同定した[文献7]。

この研究では、リガンドのコレステロール骨格の7位に存在する結合ケトンが $\beta 2\text{-GPI}$ への高親和性結合に必須であり、22位に存在するケトンでは代替することができないことが示された (図1及び表2)

25

$\beta 2\text{-GPI}$ のドメインV中の、正に荷電した14個のアミノ酸残基からなるパッチ及び可動性のループは、CL、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、及びホスファチジルグリセロールのような両親媒性化合物と相互作用するために重要であることが報告されている[文献3-5]。 $\beta 2\text{-GPI}$ のこの結合領域が、oxLDL

との相互作用にも関係していることも報告されている[文献13]。リガンドの結合ケトンは、 ω -カルボキシル基とともに親水性のスペースに配向し、 β 2-GPIに特異的に結合するものと考えられる。一般に、結合ケトンは ω -アルデヒドに比してシッフ塩基付加化合物の形成活性は低い。oxLDLと β 2-GPIとの相互作用は

5 MgCl₂、CaCl₂及びヘパリンのいずれによっても阻害されることから、 β 2-GPIリガンドは、中性pH条件下において、oxLDLと β 2-GPIとの間の非共有結合性の静電的な相互作用に関与していると考えられる。

今日、APS患者の血清中に見出される抗 β 2-GPI抗体が、PLをコートしたマイクロタイタープレートを用いたELISAにおいて、 β 2-GPIと、CL、ホ

10 スファチジルセリン及びホスファチジン酸のような負に荷電したPLsとの複合体に結合することがよく知られている[文献10]。また最近、APS患者に存在するaCLが、酸化されたCLと β 2-GPIとの間に形成されたシッフ塩基付加化合物と反応することが示されている。しかしながら、このような負に荷電したPLsは、LDLの非常にマイナーな構成成分である。LDL中のCu²⁺を介した

15 酸化産物には、9-又は13-ヒドロペルオキシ（又はヒドロキシ）-オクタデカジエノエート（octadecadienoate）、9-オキソノナノエート（9-oxononanoate）、又は9-カルボキシノナノエート（9-carboxynonanoate）でエステル化されたコレステロール/又はオキシステロールが含まれ、これらのいくつかは動脈硬化性のプラークにも存在している[文献14-16]。既に報告されて

20 いる通り[文献7]、酸化されたPLsではなくoxLig-1及びoxLig-2のような ω -カルボキシル-オキシステリルエステル（ ω -carboxyl-oxysteryl ester）が、Cu²⁺-oxLDL中において主要な β 2-GPIリガンドとして検出された。これらのin vitro及びin vivo付加化合物の性質は化学的に明らかにされていない。しかし、いくつかのコレステリルエステルの酸化修飾体と β 2-GPIとのコンジュゲートで

25 ある可能性が高い。この研究では、過剰量のNaCNBH₃（200mM）によるoxLDL12- β 2-GPI16h複合体の処理は、シッフ塩基付加物中のイミンの還元には有効ではなかった。この結果から、oxLDLと β 2-GPIとの、安定でかつ解離しない複合体はミカエル反応、又はポリ不飽和脂肪酸のアルコキシルラジカルによるリジン残基の直接的な酸化のような他のメカニズムによって生成する可能性を示している。

この研究では、APS及び／又はSLEの患者（54.1～58.7%）において、oxLDLは、 β 2-GPIとの安定な、かつ解離しない複合体として循環していることが示された。oxLDLは、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに優先的に取り込まれ、泡沫細胞の形成とアテローム硬化型の傷害の発生に至ることが多く報告されている。しかしながら、動脈硬化症の患者の血流中を循環するoxLDLに関しては不完全な形成が存在する。この実験では患者の血清中の遊離型のoxLDLを測定していないが、*in vivo*で生成されたoxLDLは内在性の β 2-GPIと複合体を形成していると考えられる（血漿中の β 2-GPIの濃度は約200 μ g/mlである）。図3Dに示した通り、*in vitro*で酸化を受けたLDLは、 β 2-GPIの存在下、中性pH条件において、インキュベーション時間の増加に伴って安定な付加物を形成する。さらに、 β 2-GPIとoxLDLとの間の安定な相互作用が、緩衝液のみ、1% BSAを含有する緩衝液、50%ヒト血清のような種々の*in vitro*条件下において観察される（データは示さない）。こうして、oxLig-1及びoxLig-2に関連する β 2-GPIリガンドは、過剰量の種々の血漿／血清タンパク質の存在下において、 β 2-GPIとoxLDLとの間で特異的な相互作用を引き起こし、安定な複合体を形成する。

aPLの、動脈／静脈血栓症、習慣流産、及び血小板減少のような重大な臨床合併症との関連は、APSの患者において確立されている。aCLは、当初、CLのような酸性PLsに結合すると考えられていたが、現在は β 2-GPIがaCLの真の抗原であると広く受け入れられている。1998年に、抗 β 2-GPI IgG抗体がSLE患者の動脈血栓症の血清マーカーとなりうることが示され、抗MDA-LDL IgG抗体は動脈血栓症とは関係しないことが示された。本研究では、抗 β 2-GPI-CL IgG抗体、抗 β 2-GPI IgG抗体、及び抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体の抗体価との間の良好な関連性が示された（図7）。抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体の出現は、静脈血栓症や習慣流産に比して、動脈血栓症の履歴と最も高い相関性を示した（表3）。これに対し、これらの抗体の有意な関連性は、血小板減少においては見られなかった。これらの知見は、 β 2-GPI-oxLig-1（ β 2-GPI-oxLDL）複合体は、aCLの真のターゲット抗原であることを示唆している。抗 β 2-GPI-oxLig-1 IgG抗体は、自己免疫疾患に基づくアテローム性血栓症／アテローム性動脈硬化症の誘発因子として有力な候補である。

しかしながら、調査したAPS/SLE患者の全ては、 β 2-GPI-oxLDL複合体陽性と陰性の2つの群に分けられ、陽性群においては、陰性群に比して抗 β 2-GPI-oxLig-1抗体とこれらの臨床症状の発症との間により強い関連性が見られた。自己抗体陽性APS患者においては、 β 2-GPIとLDLを伴うIgG免疫複合体も観察された。In vivoにおけるLDLの酸化メカニズムは未解明であるが、その結果物である β 2-GPI-oxLDL複合体は、APSにおいて、血栓症、特に動脈血栓症の発症を誘発する自己抗原として、病原性の役割を果たしていると考えられる。

Georgeらは、通常の飼料を与え、 β 2-GPIで免疫したLDL受容体欠損マウスは、アテローム性動脈硬化症が加速することを報告している[文献17]。 β 2-GPIは、内皮下領域及びピトのアテローム硬化型プラークのintimal-medial borderに豊富に存在し、単球及びCD4陽性のリンパ球と共存している[文献18]。よって、APSのアテローム発生における β 2-GPIとoxLDLが関与する自己免疫メカニズムの状況証拠がさらに高まった。

これは、安定な、かつ、解離不能な β 2-GPI-oxLDL複合体が患者の血清中に見出され、この複合体はAPSの動脈血栓症についての定量可能な危険因子であろうということの最初の報告である。しかしながら、 β 2-GPI-oxLDL複合体は、APSのみならず、抗体陰性かつ非血栓性のSLE及び慢性腎炎においても見られる。このことは、血清の複合体レベルのみではAPSにおける臨床症状を予期できないことを示している。脂質及びリポタンパク質代謝の異常は、種々の腎臓疾患及び高脂血症に共通しており、腎疾患患者のアテローム硬化性心血管性障害の高率発生や高い死亡率に関与するLDLのような血漿リポタンパク質を増加させると理解されている。これらの知見は、冠動脈疾患患者の血流中で循環する β 2-GPI-oxLDL複合体の臨床的意義についての重要な、かつ新たな問題を提起するものでもある。

本発明キットの作成

(1) 下記の構成からなる本発明キット1を作成した。

oxLDL12hを β 2-GPIとともにpH7.4、37℃で16時間インキュベートすることによって得られた β 2-GPI-oxLDL複合体 (1 mg) (スタンダード)

2. 96ウェルのイムノプレート 1枚

抗 β 2-GPI抗体 (WB-CAL-1) 1本

3. ビオチン標識した抗apoB100抗体 (1 D 2)
4. H R P 標識したアビジン
5. 5. ーフェニレンジアミン溶液 1本
6. 過酸化水素水 1本
- 5 7. 反応停止液 (1 N H C l) 1本

(2) 下記の構成からなる本発明キット2を作成した。

1. oxLDL12hを β 2-GPIとともにpH7.4、37°Cで16時間インキュベートすることによって得られた β 2-GPI-oxLDL複合体が固着された96ウェルのイムノプレート1枚
- 10 2. H R P 標識した抗ヒトI g G抗体
3. ーフェニレンジアミン溶液 1本
4. 過酸化水素水 1本

引用文献

1. J. Exp. Med., 179, p457-462(1994)
- 15 2. Blood, 87, p3262-3270(1996)
3. EMBO J., 18, p5166-5174(1999)
4. J. Mol. Biol., 304, p927-939(2000)
5. Biochemistry, 40, p8092-8100(2000)
6. Clin. Exp. Immunol., 107, p569-573(1997)
- 20 7. J. Lipid Res., 42, p697-709(2001)
8. J. Immunol., 149, p1063-1068(1992)
9. Arthritis Rheum., 37, p1453-1461(1994)
10. J. Immunol., 148, p3885-3891(1992)
11. J. Clin. Invest., 43, p1345-1353(1955)
- 25 12. Anal. Biochem. 95, p351-358(1979)
13. Int. Immunol., 12, p1183-1192(2000)
14. Anal. Biochem., 213, p79-89(1993)
15. J. Lipid Res., 36, p1876-1886(1995)
16. J. Lipid Res., 38, p1347-1360(1997)

1 7. Circulation, 98, p1108-1115(1998)

1 8. Circulation, 99, p2227-2230(1999)

産業上の利用の可能性

本発明スタンダードを用いると、特に生体内に存在する β 2-GPI-oxLDL複合体
5 を、より正確かつ厳密に測定することができ、さらにこれによって本発明測定方
法 1、本発明検出方法 1、及び本発明キット 1 が提供されることから極めて有用
である。

また本発明抗原を用いると、特に生体内に存在する「 β 2-GPI-oxLDL複合体を
認識する抗体」を、より正確かつ厳密に測定することができ、さらにこれによっ
10 て本発明測定方法 2、本発明検出方法 2、本発明固相、及び本発明キット 2 が提
供されることから極めて有用である。また、本発明測定方法 3 によれば、 β 2-
GPI又はLDLと共に形成されたIgG免疫複合体を、簡便かつ迅速に検出することが
できることから極めて有用である。

請求の範囲

1. 「酸化LDLと β 2-GPIとが共有結合した複合体」を成分とする、検体中の「酸化LDLと β 2-GPIとの複合体」を測定するためのスタンダード。
- 5 2. 「酸化LDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる酸化LDLと β 2-GPIとの複合体」を成分とする、検体中の「酸化LDLと β 2-GPIとの複合体」を測定するためのスタンダード。
3. 「酸化LDLと β 2-GPIとを、37℃、pH7.4の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる酸化LDLと β 2-GPIとの複合体」が、以下の(a)及び(b)の性質を有することを特徴とする、請求項2に記載のスタンダード。
 - (a) 100単位/mlのヘパリンを共存させても、複合体を構成する酸化LDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。
 - 10 (b) 10mMのMgCl₂を共存させても、複合体を構成する酸化LDLと β 2-GPIとが実質的に解離しない。
4. 検体が、生体由来の検体である、請求項1～3のいずれか1項に記載のスタンダード。
5. 生体由来の検体が、血液である、請求項4に記載のスタンダード。
- 20 6. 請求項1～5のいずれか1項に記載のスタンダードを用いることを特徴とする、検体中の「酸化LDLと β 2-GPIとの複合体」の測定方法。
7. 検体中の「酸化LDL」と「 β 2-GPI」とを共有結合させるステップを少なくとも含む、請求項6に記載の測定方法。
8. 検体中の「酸化LDL」と「 β 2-GPI」とを、予めpH3～9の条件下でインキュベートするステップを少なくとも含む、請求項6に記載の測定方法。
 - 25 9. 検体中の「『酸化LDL』と『タンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、アミノ糖又はアミノ脂質』とが静電的に結合した複合体」を解離させるステップを少なくとも含む、請求項6に記載の測定方法。
 10. 請求項6～9のいずれか1項に記載の測定方法を用いて検体中の「酸化

LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体」を測定し、測定された「検体中の当該複合体」と疾患とを関連づけることを特徴とする、疾患の検出方法。

11. 疾患が、抗リン脂質抗体症候群、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化及び糖尿病からなる群から選ばれるものである、請求項10に記載の検出方法。

12. 請求項1～5のいずれか1項に記載のスタンダードを構成成分として含むことを特徴する、検体中の「酸化LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体」の測定キット。

13. さらに「『酸化LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体』を認識する抗体」を構成成分として含むことを特徴とする、請求項12に記載の測定キット。

14. 疾患の検出に用いられることを特徴とする、請求項12又は13に記載の測定キット。

15. 「酸化LDLと $\beta 2-GPI$ とが共有結合した複合体」を成分とする、検体中の「『酸化LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体』を認識する抗体」を測定するための抗原。

16. 「酸化LDLと $\beta 2-GPI$ とを、 37°C 、 $\text{pH}7.4$ の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる酸化LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体」を成分とする、検体中の「『酸化LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体』を認識する抗体」を測定するための抗原。

20 17. 「酸化LDLと $\beta 2-GPI$ とを、 37°C 、 $\text{pH}7.4$ の条件下で16時間インキュベートすることによって得られうる酸化LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体」が、以下の(a)及び(b)の性質を有することを特徴とする、請求項16に記載の抗原。

(a) 100単位/mlのヘパリンを共存させても、複合体を構成する酸化LDLと $\beta 2-GPI$ とが実質的に解離しない。

(b) 10mMの MgCl_2 を共存させても、複合体を構成する酸化LDLと $\beta 2-GPI$ とが実質的に解離しない。

18. 請求項15～17のいずれか1項に記載の抗原を用いることを特徴とする、検体中の「『酸化LDLと $\beta 2-GPI$ との複合体』を認識する抗体」の測

定方法。

19. 請求項18に記載の測定方法を用いて検体中の「『酸化LDLと β 2-GPIとの複合体』を認識する抗体」を測定し、測定された「検体中の当該抗体」と疾患とを関連づけることを特徴とする、疾患の検出方法。

5 20. 疾患が、抗リン脂質抗体症候群、血栓症、動脈血栓症、静脈血栓症、習慣流産、腎疾患、動脈硬化及び糖尿病からなる群から選ばれる、請求項19に記載の検出方法。

21. 請求項15～17のいずれか1項に記載の抗原が固着された固相。

22. 請求項21に記載の固相を構成成分として含むことを特徴する、検体中
10 の「『酸化LDLと β 2-GPIとの複合体』を認識する抗体」の測定キット。

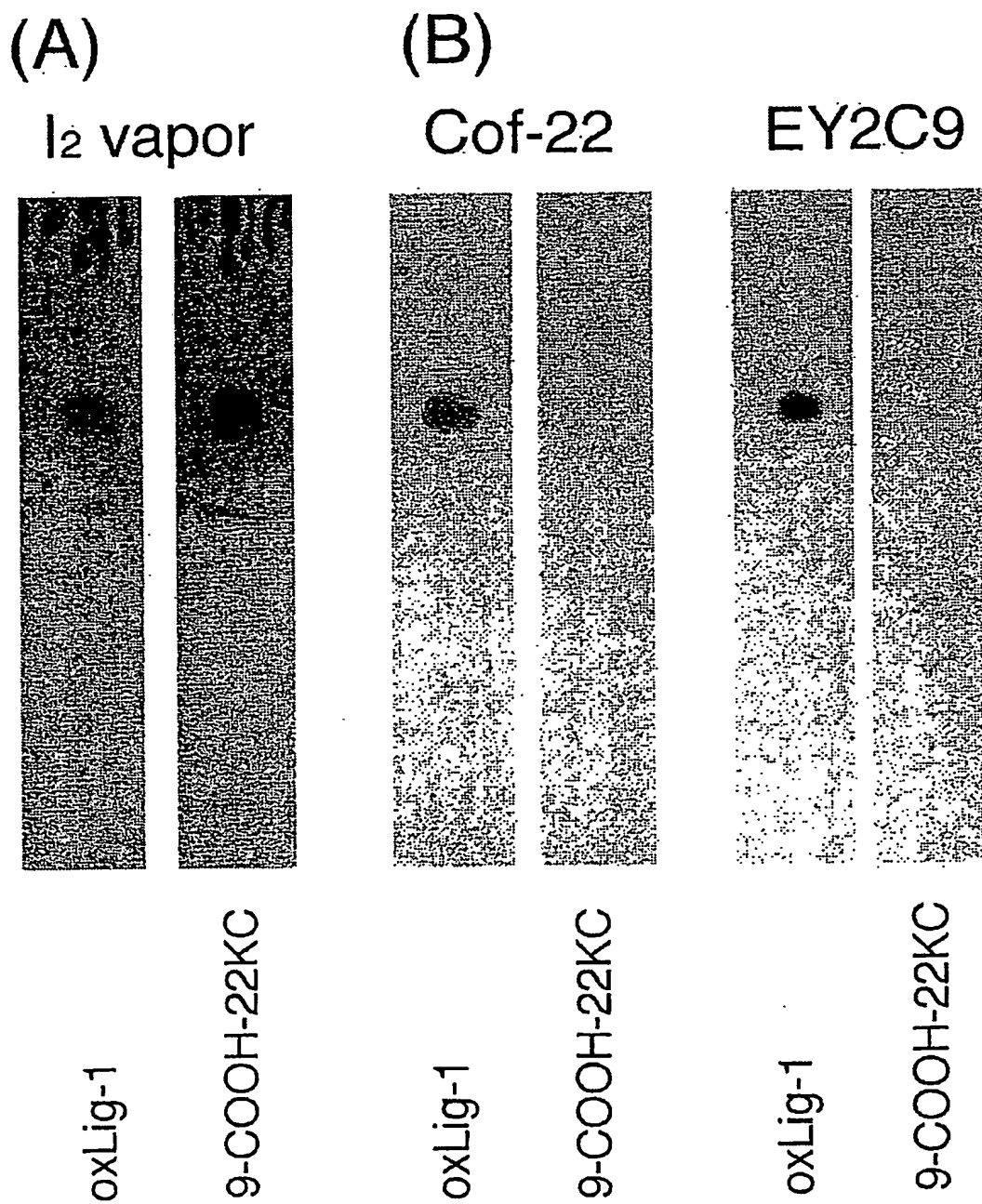
23. さらに「『酸化LDLと β 2-GPIとの複合体』を認識する抗体」に結合する物質を構成成分として含むことを特徴とする、請求項22に記載の測定キット。

24. 疾患の検出に用いられることを特徴とする、請求項23に記載の測定キ
15 ャット。

25. 「 β 2-GPIを認識する抗体」及び／又は「LDLを認識する抗体」、並びに抗IgG抗体を用いることを特徴とする、検体中の免疫複合体の測定方法。

1/9

FIG. 1



BEST AVAILABLE COPY

FIG. 2

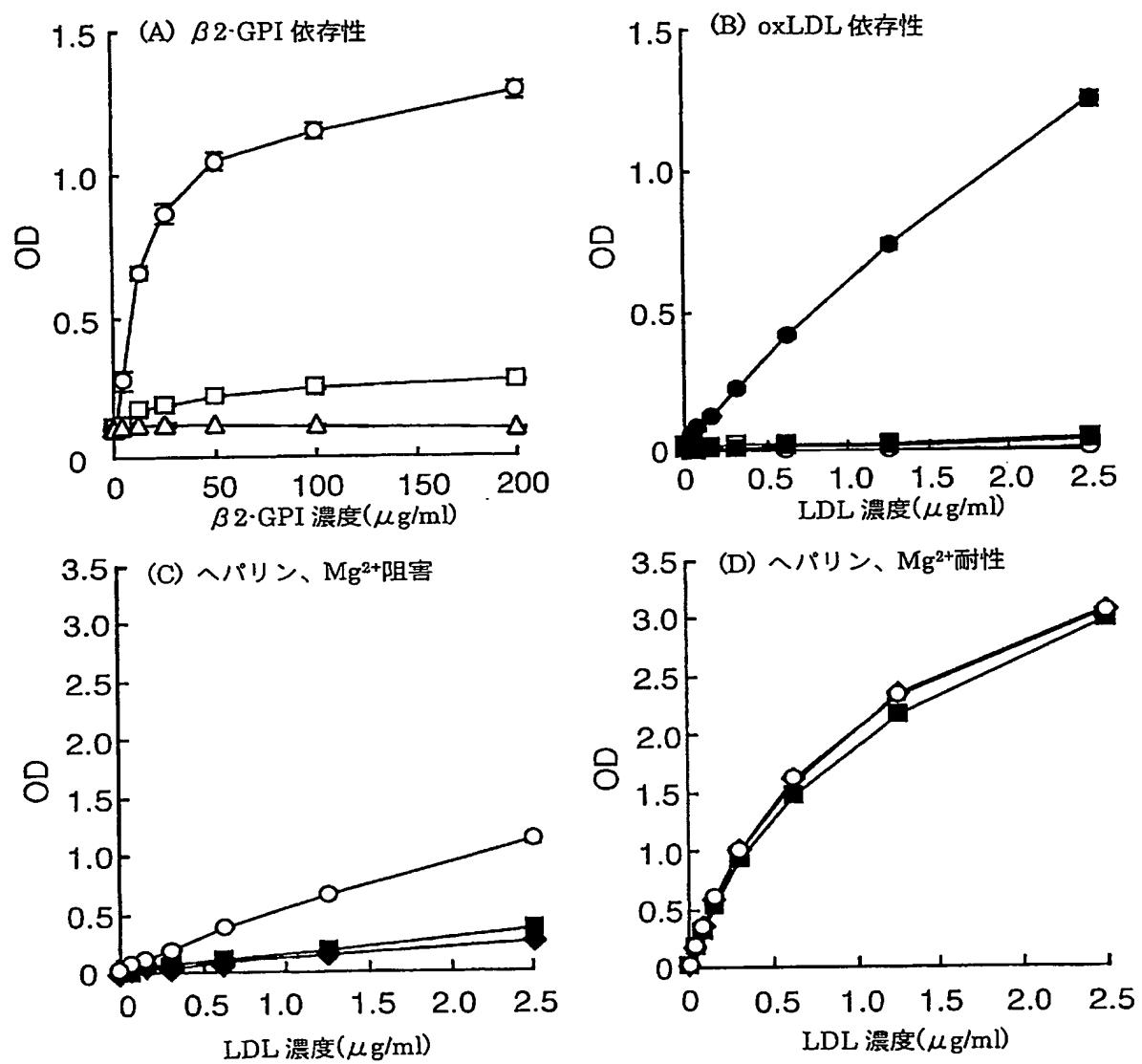


FIG. 3

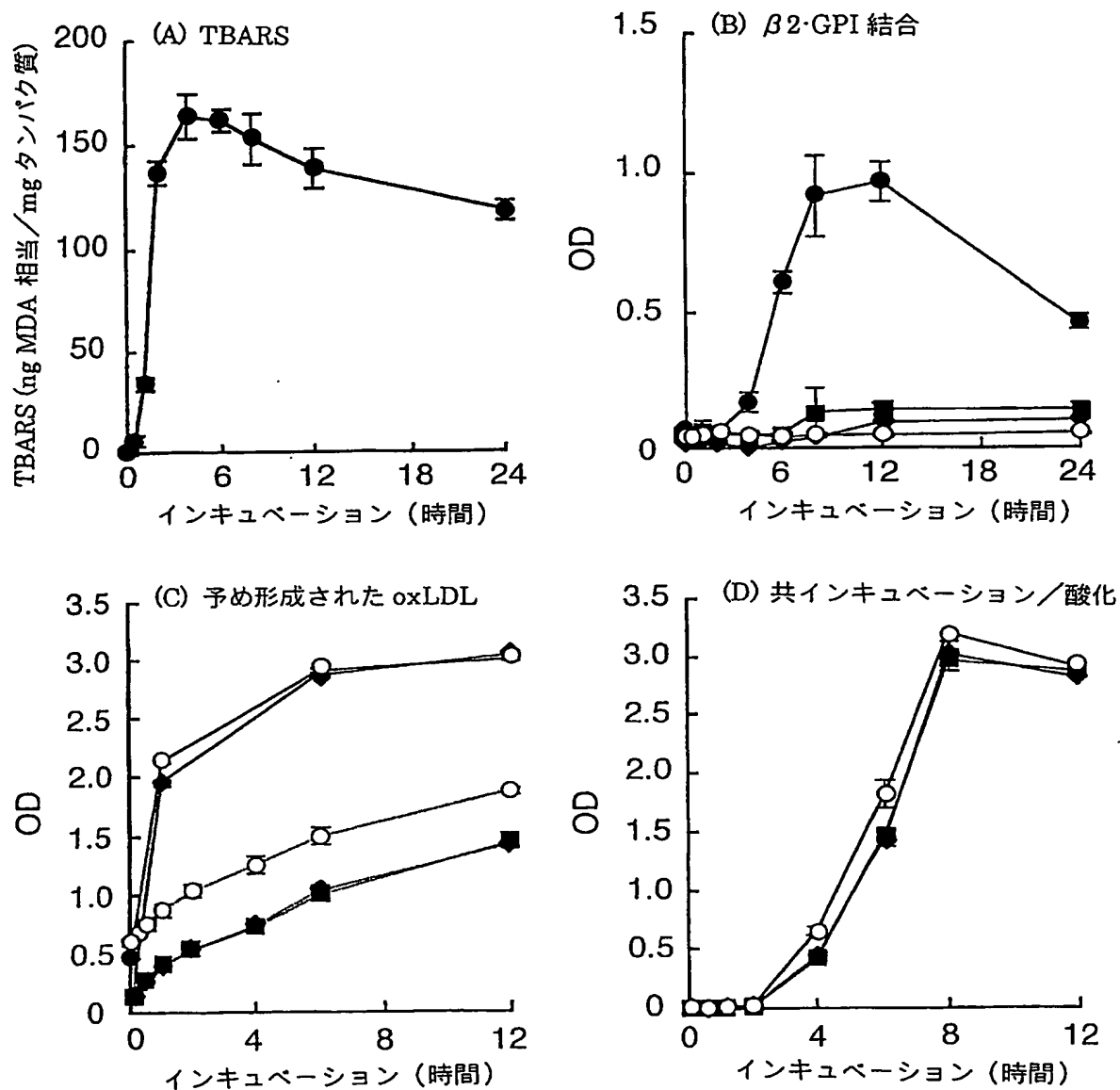
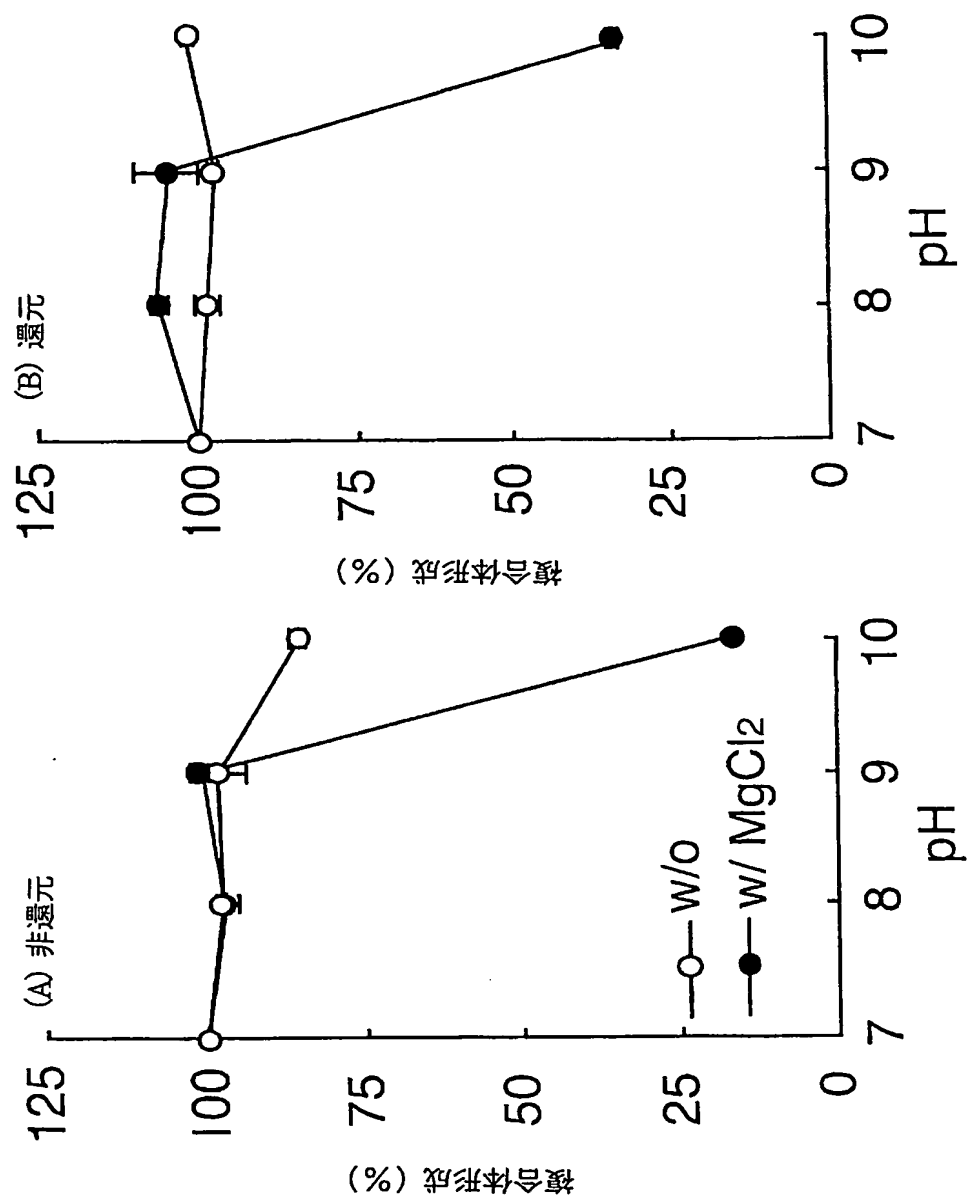
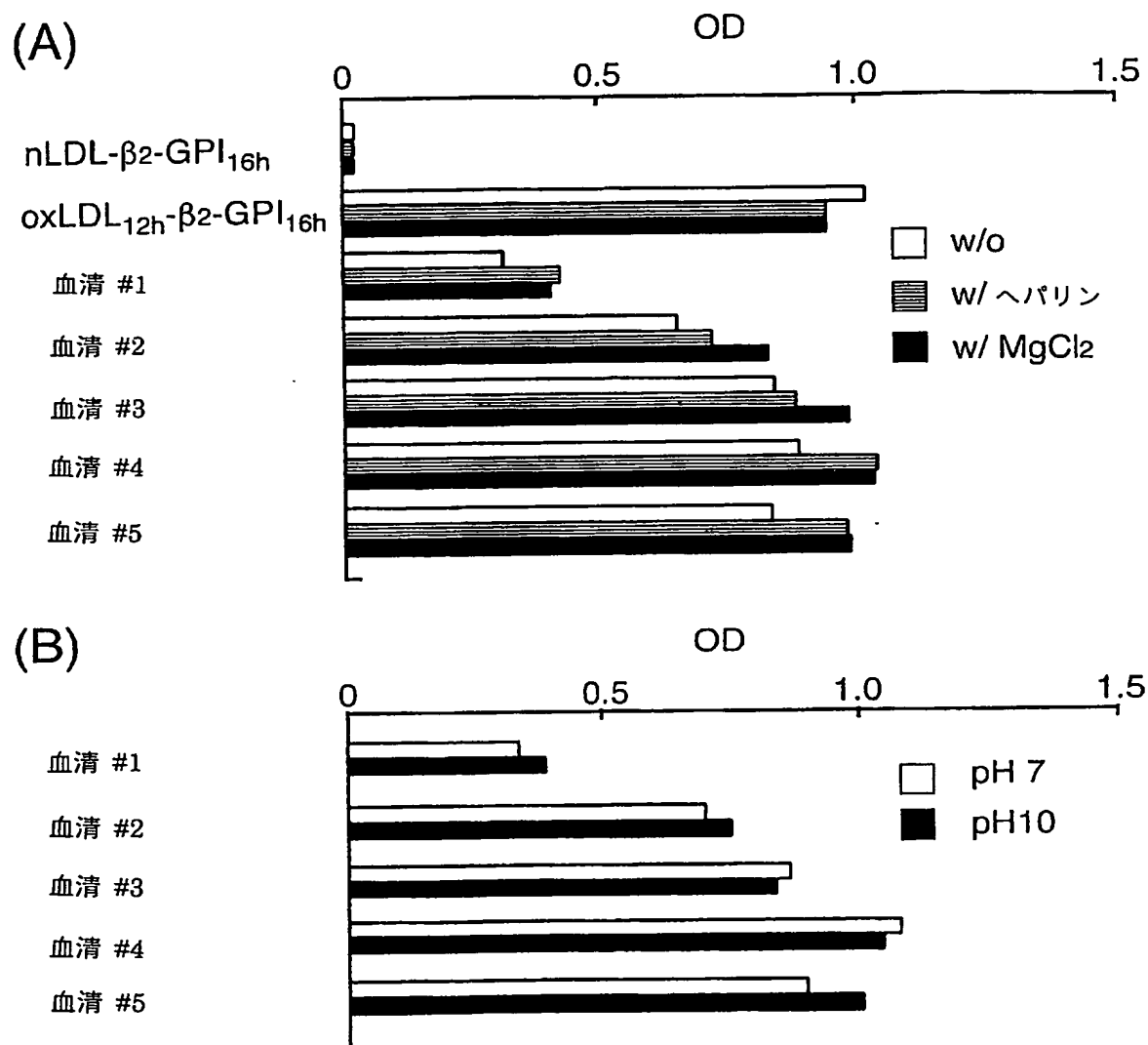


FIG. 4



5/9

FIG. 5



BEST AVAILABLE COPY

FIG. 6

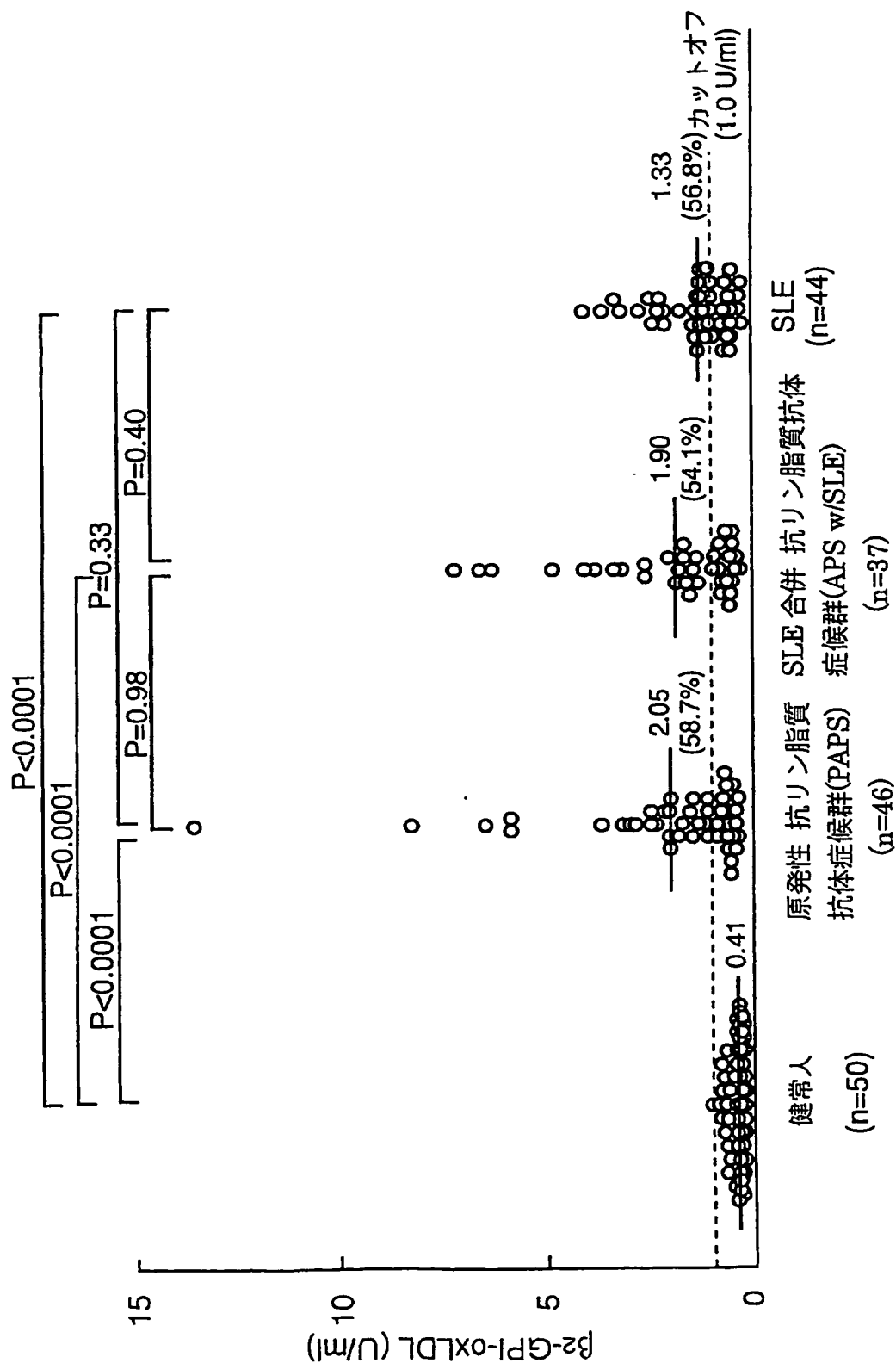
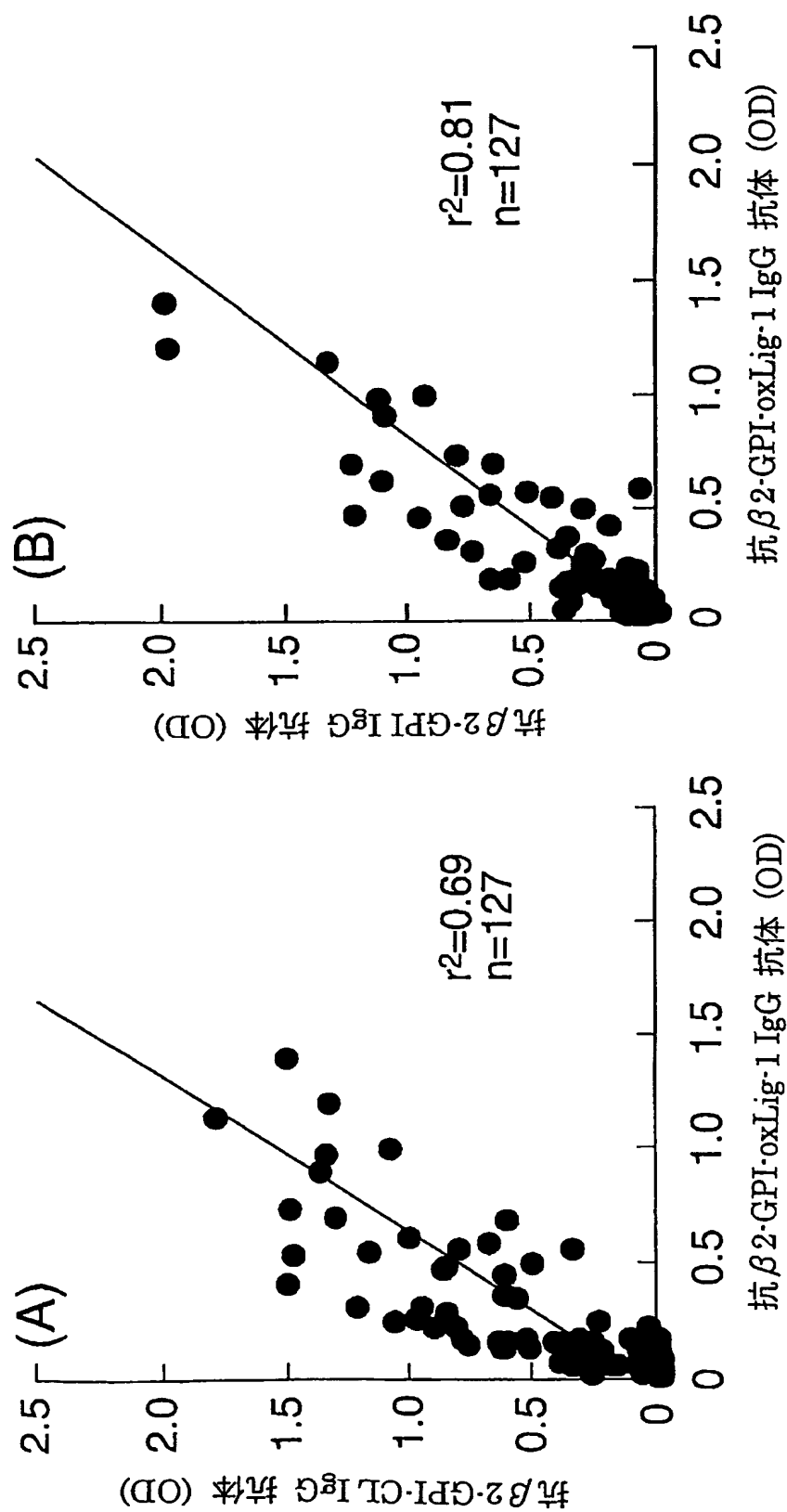
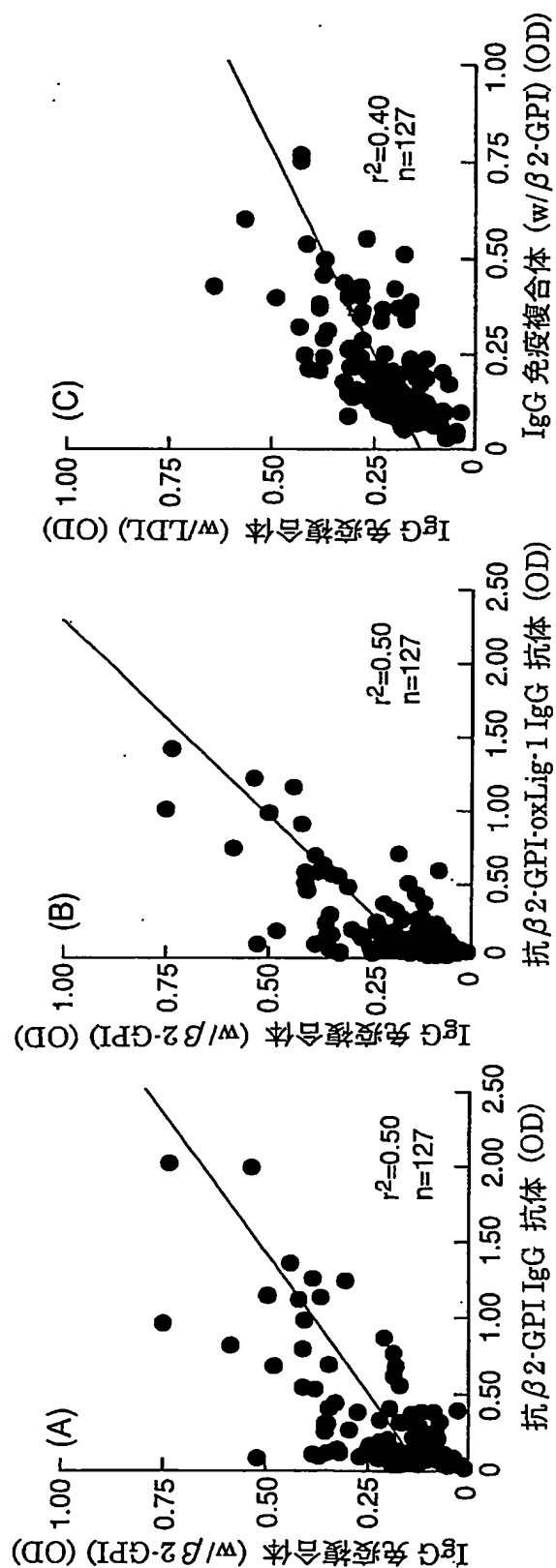


FIG. 7



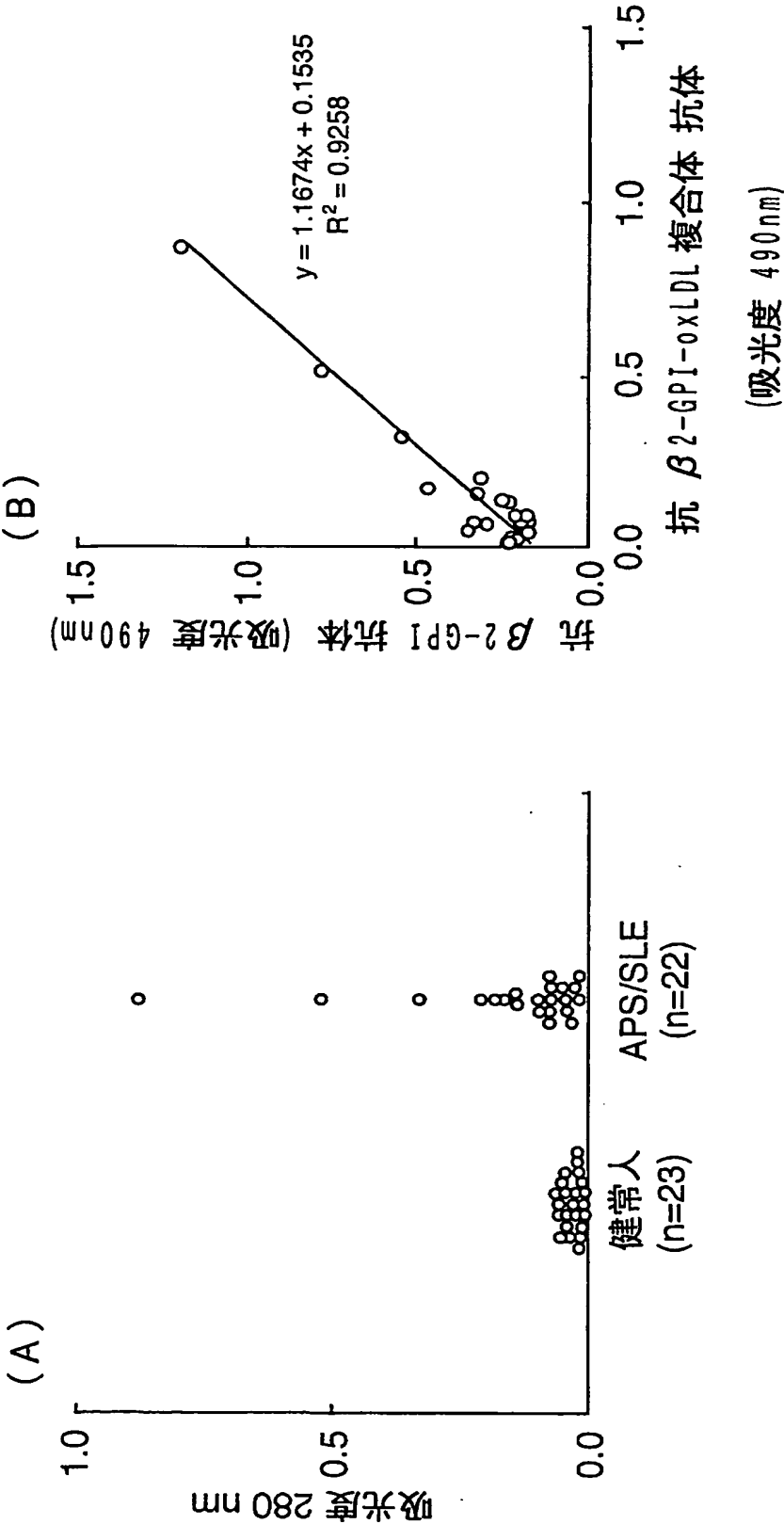
8/9

FIG. 8



BEST AVAILABLE COPY

FIG. 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/96

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/48-98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 95/09363 A (Yamasa Corp.), 06 April, 1995 (06.04.95), Full text & EP 722086 A & US 5900359 A	25/1-24
Y	JP 7-306202 A (Maruzen Petrochemical Co., Ltd.), 21 November, 1995 (21.11.95), Par. No. [0012] (Family: none)	25
A	KOIKE, "Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis", Annals of Medicine Vol.32, No.suppl.1, (2000), pages 27 to 31	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 October, 2003 (09.10.03)Date of mailing of the international search report
28 October, 2003 (28.10.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11388

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOBAYASHI et al., "A specific ligand for β 2-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages", Journal of Lipid Research Vol.42, No.5(2001), pages 697 to 709	1-25

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/96

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/48-98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2003年

日本国登録実用新案公報 1994-2003年

日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	WO 95/09363 A (ヤマサ醤油株式会社) 1995. 04. 06 全文 & EP 722086 A & US 5900359 A	25/1-24
Y	JP 7-306202 A (丸善石油化学株式会社) 1995. 11. 21 【0012】 (ファミリーなし)	25
A	KOIKE, "Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis" Annals of Medicine Vol. 32, No. suppl. 1, (2000) p. 27-31	1-25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 10. 03

国際調査報告の発送日

28. 10. 03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



2J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KOBAYASHI et al, "A specific ligand for β 2-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages" Journal of Lipid Research Vol. 42, No. 5 (2001) p. 697-709	1-25